

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
DISCIPLINE ANATOMOISTOPATOLOGICHE
VETERINARIE

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET/ 03

APPLICAZIONI IMMUNOCITOCHIMICHE NELLA
CITODIAGNOSTICA ONCOLOGICA VETERINARIA

Presentata da: Dott. Alessandro Cesari

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof.
Paolo Stefano Marcato

Relatore

Chiar.mo Prof.
Giuliano Bettini

Esame finale anno 2009

1. INTRODUZIONE

La citologia è uno strumento diagnostico comunemente utilizzato nella pratica clinica dei piccoli animali e consente, tramite una procedura poco invasiva, la raccolta di un campione cellulare ed il rapido allestimento di un preparato mediante tecniche piuttosto semplici (Meyer, 1996; Meinkoth et al., 2002a). Dal punto di vista diagnostico, se comparata all'istologia, la citologia presenta il vantaggio di permettere una migliore valutazione della morfologia cellulare dei singoli elementi e lo svantaggio di fornire solo informazioni limitate e parziali sull'architettura globale del tessuto (Griffith et al., 1984). Dal punto di vista pratico, uno dei principali motivi per cui la citologia è così comunemente utilizzata nella pratica ambulatoriale è il fatto di dare risultati sufficientemente attendibili in tempi brevi (Flens et al., 1990).

Talvolta però la diagnosi citologica, soprattutto nei casi di neoplasia maligna, non può essere raggiunta con i soli criteri citomorfologici. Per esempio la classificazione di talune neoplasie può risultare complicata (Flens et al., 1990), come per l'istopatologia, nel caso delle neoplasie indifferenziate o nelle metastasi provenienti da tumori la cui origine è ignota (De Nicola et al., 1998; Meinkoth et al., 2002b). Quando la morfologia è insufficiente per determinare la linea cellulare di origine si può ricorrere all'uso di test più specifici come la microscopia elettronica, la citochimica, la citometria a flusso, l'immunocitochimica e l'immunoistochimica. In questa tesi, nello specifico, si esaminerà la tecnica dell'immunocitochimica.

L'immunocitochimica è uno strumento diagnostico utilizzato ampiamente in medicina umana e meno frequentemente in medicina veterinaria, nonostante vari autori abbiano dimostrato la sua efficacia anche in questo campo (Barsotti et al., 2007; Caniatti et al., 1996; Höinghaus et al., 2008, Lara-Garcia et al., 2008; Takauji et al., 2007).

Questa tecnica è ritenuta molto importante per tipizzare i tumori, tuttavia Koss (1990), in uno studio condotto su pazienti umani, afferma che "...l'uso di una batteria di anticorpi sui preparati citologici è molto costoso e raramente premia lo sforzo fatto" e che "...i risultati dell'immunocitochimica variano a seconda del tipo di anticorpo testato e delle capacità tecniche del laboratorio, i risultati non sono sempre facilmente interpretabili ed il problema delle positività dubbie complica ulteriormente l'interpretazione". Anche altri autori che si occupano di medicina

umana (Chess et al., 1986; Flens et al., 1990; Mason et al., 1986) non sono entusiasti come lo sono invece i pionieri di questa tecnica (Nadij, 1980). Chess et al.(1986) hanno mostrato che solo il 63% delle reazioni positive e l'88% delle reazioni negative concorda con la diagnosi citologica; Flens et al. ancora(1990) hanno stimato che l'immunocitochimica contribuisce alla diagnosi solo nel 50% dei casi ai quali viene applicata. Mitteldorf et al., invece, con un lavoro condotto su 100 casi citologici prelevati da pazienti umani, ha attestato l'utilità dell'immunocitochimica nell'82% dei casi (Mitteldorf et al., 1999).

Molti autori hanno lavorato con questa tecnica dimostrandone l'attendibilità e l'utilità sia nella medicina umana sia in quella veterinaria, applicandola con successo a numerosi campi di indagine oltre all'oncologia, spaziando dall'ematologia (Harir et al., 2007; Ledieu et al., 2005; Niemann et al., 2007) alla neurologia (Jinno et al., 2008; Pavlov et al., 2008; Stanzel et al., 2008), dalla microbiologia (Kocks et al., 2005; Perozo et al., 2008; Piattoni et al., 2006) alla dermatologia (Hoinghaus et al., 2007).

Ci sono indubbiamente una grande quantità di motivi dietro alle diverse posizioni prese dagli autori nei confronti dell'immunocitochimica, tra le quali quelle di maggior rilevanza sono:

- 1- se comparata all'istologia, il numero dei preparati citologici utilizzabili è generalmente limitato e quindi è possibile effettuare solo un certo numero di incubazioni con gli anticorpi;
- 2- anche se ci sono campioni a sufficienza per incubare tutti gli anticorpi ritenuti necessari, non è possibile sapere a priori se nel vetro incubato ci sono le cellule diagnostiche fino a che non è già stato colorato e montato;
- 3- dato che le cellule nei preparati citologici mantengono la loro forma sferica, le positività citoplasmatiche possono mascherare l'organizzazione della cromatina all'interno del nucleo rendendone difficile la valutazione;
- 4- la sovrapposizione delle cellule nei preparati citologici può rendere difficoltosa la lettura dei preparati stessi;
- 5- i campioni possono derivare da diversi siti per cui può essere necessaria una differente preparazione, prima dell'applicazione della tecnica, legata al diverso contenuto di cellule e proteine;

6- la qualità dei risultati dipende moltissimo delle capacità tecniche del laboratorio che effettua la colorazione e soprattutto dall'abilità nel campionamento di chi effettua il prelievo.

Questo lavoro è teso a descrivere ed a presentare il nostro approccio e la nostra esperienza nell'uso delle tecniche immunocitochimiche sui campioni citologici prelevati tramite ago-aspirato.

1.1 Principi di base per l'applicazione delle metodiche immunocitochimiche alla citologia

Spesso i citopatologi cadono nell'errore di applicare le tecniche imparate per l'istologia ai campioni citologici (Leong et al., 1999; Leung et al., 1996; Suthipintawong et al., 1996; Wilbur, 1993). Sfortunatamente questo salto istologia-citologia viene effettuato, di volta in volta, senza considerare preventivamente le differenze dei due tipi di campione che potrebbero compromettere la corretta interpretazione finale del preparato e quindi la diagnosi. Nonostante i vari avvertimenti pubblicati sui rischi legati al continuo variare delle tecniche a livello intra ed interlaboratorio, alcuni citologi sembrano dimenticare questi consigli nel momento in cui si ritrovano sollecitati da un clinico a formulare la diagnosi, spesso partendo da una quantità iniziale di campioni veramente esigua (Leong et al., 1999; Leung et al., 1996; Suthipintawong et al., 1996; Swanson et al., 2005; Wilbur, 1993). Generalmente il risultato di questo *modus operandi* è la produzione di un preparato interpretabile solamente in maniera molto soggettiva e difficilmente riproducibile (Fowler et al., 2008).

Il primo errore, abbastanza comune, è quello di utilizzare un nuovo anticorpo non standardizzato sfruttando protocolli scritti per l'immunoistochimica ed applicandoli ad un campione citologico direttamente, senza tener conto delle innumerevoli differenze tra i preparati. Questo tipo di errore è solitamente provocato dal fatto che il patologo trova determinate procedure scritte in letteratura e decide di applicarle prima di poter notare il piccolo numero di casi sui quali la procedura stessa è stata testata. Se il laboratorio che tenta questo tipo di approccio non ha a disposizione un pool abbastanza ampio di campioni omogenei (per specie e tipo di campione) allora spesso si troverà a lavorare alla cieca, senza possibilità

di utilizzare controlli positivi e negativi, e quindi i risultati ottenuti saranno da considerare sospetti. Questo aspetto importantissimo viene, in molti lavori, trascurato sia nell'abstract che nei materiali e metodi. I controlli dovrebbero essere simili al campione da testare e questo può essere uno scoglio non indifferente per il laboratorio di immunocitochimica, sia per la difficoltà di reperimento della varietà necessaria degli stessi (tipo di campione, specie, fissativi...), sia per la difficoltà di reperirne una quantità sufficiente a sostenere il lavoro di routine, sia per il problema dello stoccaggio adeguato di tutto questo materiale (Wick et al., 2002). Bisogna tener conto infatti che le concentrazioni suggerite dalle ditte che producono anticorpi talvolta non sono valutate per l'immunocitochimica, con il risultato che possono essere di molto superiori (falsi positivi dovuti all'eccesso di anticorpo) o inferiori al necessario (Dalquen et al., 1993). Inoltre, in letteratura, è possibile trovare articoli con risultati discordanti su vari argomenti di importanza cruciale per il funzionamento delle tecniche immunocitochimiche: esistono lavori di medicina umana che indicano come un'errata fissazione dei campioni possa inficiare la reazione di taluni anticorpi, come, per esempio quelli utilizzati anti-recettore per gli estrogeni e l'S110 su campioni fissati in alcool (Brown, 1994) ed altri lavori in cui gli autori affermano di essere riusciti ad ottenere la positività di questo recettore partendo dalle medesime condizioni di fissazione (Sneige, 2006). E' fondamentale quindi valutare attentamente, al momento dell'approccio alla tecnica, anche le differenze tra gli anticorpi prodotti dalle varie ditte e tra le varie metodiche utilizzate in ciascun articolo. E' stato descritto infatti come più anticorpi, sebbene specifici tutti per il medesimo antigene, siano in grado di reagire in maniera anche molto differente a seconda del clone di origine. Questo è uno dei motivi per cui è bene non acquistare, almeno come primo approccio ad un nuovo anticorpo, prodotti prediluiti: nel caso in cui la concentrazione consigliata risulti non reattiva o dia positività dubbie sarà sempre possibile testare e trovare una diluizione d'uso ottimale (Hsi, 2000; Vilches-Moure et al., 2005).

E' noto poi come certe tecniche di fissazione e allestimento risultino migliori per ottenere la reazione di determinati anticorpi. Tuttavia, prima di cominciare ad operare una diversificazione della tecnica di base, è necessario chiedersi se il proprio laboratorio ha i mezzi per sostenere senza problemi un tale carico di variabili senza alterare i risultati e, soprattutto, se si ha la possibilità di svolgere un numero sufficiente di test per verificare che i risultati rimangano ripetibili. Spesso

la risposta corretta a questa domanda dovrebbe essere “probabilmente no” (Fowler et al., 2008).

Un secondo, grosso errore che si tende a commettere è quello di intraprendere metodiche di citoinclusione senza averla prima esaminata sufficientemente. La citoinclusione è una tecnica che permette di includere in paraffina il materiale cellulare prelevato da liquidi di varia natura quale, ad esempio, i versamenti. Questa tecnica, sebbene piuttosto datata, ancora oggi gode di grande popolarità tra i patologi per varie ragioni, non ultima la possibilità di applicare direttamente le metodiche immunoistochimiche su campioni citologici senza la necessità di modificare i protocolli per adattarsi al differente tipo di campione. Esistono e sono state pubblicate numerose tecniche di preparazione dei citoinclusi tuttavia, prima di implementarle all'interno dei propri protocolli è necessario valutare i risultati ottenuti nei lavori con un determinato tipo di citoinclusione e confrontarli con la relativa immunoistochimica del caso (Fowler et al., 2008).

Il terzo errore, forse il più frequente, è quello di ordinare un numero esiguo di strisci citologici al chirurgo, il che esita nell'impossibilità di testare nella sua interezza il più adeguato pannello di anticorpi o, se necessario, di ripetere una determinata prova nel caso i risultati risultino dubbi o poco convincenti. Inoltre deve essere chiaro che la diagnosi non può essere ottenuta sulla base della reazione positiva di un unico anticorpo: questo atteggiamento non farebbe altro che confondere il patologo facendogli avvalorare il sospetto diagnostico iniziale. Andrebbero invece sempre valutati anche i risultati negativi, in modo da potersi orientare in maniera più corretta all'interno della diagnosi differenziale. Al momento della valutazione dei risultati di un test immunocitochimico, sarebbe bene tener presenti i “principi di Swanson” (Swanson, 1993):

1. Le analisi immunocitochimiche devono essere valutate all'interno di un contesto di diagnosi clinica, istologica o citologica eseguita in maniera coscienziosa ed accurata;
2. Le colorazioni eseguite con singoli anticorpi difficilmente sono in grado di fornirci una diagnosi, anche in uno scenario di diagnosi differenziale estremamente ridotta;
3. I pannelli anticorpali non sono, di per loro, specifici per giungere ad una determinata diagnosi, tuttavia vari profili anticorpali facilmente riproducibili hanno

dimostrato un certa utilità al fine di orientarsi all'interno di diagnosi differenziali stilate accuratamente.

In più, quando si accerta la presenza di una grave infiammazione acuta o di necrosi eccessiva, durante la lettura dovrebbe essere usata la massima cautela . Varie pubblicazioni esprimono pareri discordanti riguardo al valore delle interpretazioni ottenibili in queste condizioni (Judkins et al., 1998).

Tabella 1: Vantaggi e svantaggi dei principali metodi di allestimento dei preparati citologici

Metodi di allestimento dei preparati citologici	
Vantaggi	Svantaggi
Striscio da agoaspirato	
<ul style="list-style-type: none"> • Necessita di pochissimo materiale • Non son necessari campioni liquidi • Può essere utilizzato materiale precedentemente campionato anche per altri scopi (non ci sono costi extra per allestimenti aggiuntivi) 	<ul style="list-style-type: none"> • Talvolta gli artefatti legati all' "effetto fondo" possono essere notevoli • E' difficile avere abbastanza preparati per sottoporre il campione ad un pannello anticorpale completo • Sono richiesti titoli anticorpi diversi dalle altre tecniche • Le colorazioni e le contaminazioni antecedenti al test immunocitochimica possono influenzarne i risultati
Citospin	
<ul style="list-style-type: none"> • Utile quando si ha poco materiale a disposizione • E' possibile eseguire un pannello anticorpale 	<ul style="list-style-type: none"> • L' artefatto dell' "effetto fondo" è praticamente sempre presente • Sono richiesti titoli anticorpi diversi dalle altre tecniche • E' necessaria un' aliquota di materiale liquido sulla quale eseguire la prova
Citoinclusione	
<ul style="list-style-type: none"> • I preparati così allestiti possono essere trattati direttamente dal laboratorio di immunoistochimica (previo utilizzo degli adeguati controlli) • Il materiale è facilmente stoccabile 	<ul style="list-style-type: none"> • I campioni poco cellulari non possono essere allestiti con questa tecnica • La tecnica di citoinclusione che si vuole applicare deve essere adeguatamente testata prima di venire applicata

Oltre alle insidie sopra menzionate, altri fattori tecnici da considerare sono, nel caso in cui la scelta per l'allestimento del preparato sia ricaduta su strisci da ago aspirato (o su strisci a tecnologia monostrato) e la fissazione sia avvenuta in

formalina, se prendere in considerazione o meno la digestione enzimatica o i passaggi in microonde per ripristinare l'antigenicità dei campioni che spesso viene mascherata dall'azione di questo tipo di fissativo. Recentemente, in medicina umana, sono state messe in evidenza una quantità ingente di discrepanze nella qualità delle colorazioni e delle interpretazioni dei preparati colorati tramite immunocolorazioni, anche semplicemente nel contesto dell'immunoistochimica (Dorfman et al., 2006; Fitzgibbons et al., 2006; Jasani, 2006; Layfield et al., 2003). Anche in medicina veterinaria vari autori sottolineano la necessità di adottare delle linee guida comuni (Ramos-Vara et al., 2008). Tutte le difformità sopra riportate sono riconducibili a variazioni applicate alle metodiche, a lievi differenze tra i prodotti dei fornitori o anche solo all'interno dei singoli lotti di prodotto. Tutti questi fattori sembrano avere la tendenza a far equivocare positività aspecifiche o colorazioni di fondo attribuendo loro significati ben più importanti (falsi positivi). Sarebbe nell'interesse di ogni laboratorio assicurarsi, tramite l'uso di controlli o di campioni la cui reattività è ben nota, che le modifiche applicate ai propri protocolli non alterino i risultati ottenibili o che complichino la lettura al punto da condurre il patologo a diagnosi errate, soprattutto nelle situazioni in cui il management clinico del paziente dipenda dall'esito dell'esame eseguito (Fowler et al., 2008).

E' necessario ricordare inoltre come la diagnosi di benignità o malignità di una lesione debba essere raggiunta attraverso l'istologia o la citologia. Attualmente infatti non esiste alcun anticorpo in grado di predire correttamente il potenziale di malignità nel 100% dei casi. D'altra parte, il valore prognostico aumenta quando si procede ad affiancare agli aspetti morfologici citologici ed istologici i markers adatti (Fowler et al., 2008).

Infine, bisogna tenere conto di un ultimo, importantissimo fattore: esistono differenze anche notevoli tra i prodotti delle varie ditte produttrici di anticorpo, tra i lotti prodotti da una stessa ditta e tra le numerosissime metodiche disponibili per le applicazioni immunocitochimiche.

Tutta questa variabilità può certamente influire sui risultati ottenibili (Fowler et al., 2008).

Tabella 2: Principali cause di “Falsi” nell’applicazione delle metodiche immunocitochimiche

PRINCIPALI CAUSE DI ERRORE NELLE METODICHE IMMUNOCITOCHIMICHE
Falsi Positivi
<ul style="list-style-type: none"> -Cellule rotte, degenerate o estese aree di necrosi; -Infiammazione acuta che si insinua nella zona di campionamento (i neutrofili contengono per ossidasi); -Titolo anticorpale troppo alto; -Anticorpo non sufficientemente specifico.
Falsi Negativi
<ul style="list-style-type: none"> -Problemi tecnici procedurali (errato anticorpo, mancato passaggio nell’applicazione di una metodica,...); -Errori di fissazione (S100 e recettore per gli estrogeni fissati in etanolo,...); -Contaminazione dei preparati da composti inibenti la reazione (formalina post-fissazione, quantità eccessive di gel da ecografia nel materiale campionato,...); -Sensibilità variabile dell’anticorpo (questo tipo di variazioni possono essere notevoli passando da ditta a ditta, ma anche da lotto a lotto).

2. STANDARDIZZAZIONE DELLA METODICA

Il primo anno di ricerca è stato dedicato alla standardizzazione della tecnica immunocitochimica. Durante questo periodo di standardizzazione sono state testate molte possibili varianti dei numerosi passaggi obbligati presenti in questa metodica al fine di ottenere, una volta applicata alla diagnostica citologica di routine, dei preparati che presentino una positività chiara ed indubbia e mantengano al contempo le condizioni ideali per la lettura e l'interpretazione del quadro patologico rappresentato.

2.1 Materiali e Metodi

2.1.1 Campioni

Sono stati prelevati, in sede necroscopica, vari campioni di organi e tessuti di cane e gatto al fine di allestire dei preparati su cui standardizzare la metodica.

Tali tessuti e organi provenivano tutti da animali morti da meno di 24 ore. Dagli stessi pezzi sono stati allestiti anche preparati istologici, al fine di verificare lo stato di conservazione e le eventuali patologie in corso.

Al fine di standardizzare la metodica per gli anticorpi di uso più comune, sono stati campionati dei linfonodi di cane e gatto (sui quali sono stati standardizzati gli anticorpi anti-antigene comune mielo-istiocitario, anti-CD18 canino e felino, anti-CD3, anti-CD45RA, anti-CD79 α , anti-lisozima ed anti-vimentina), della cute sana di cane (sulla quale sono stati standardizzati gli anticorpi MIB1, anti-telomerasi, anti-pancitocheratina, anti-citocheratina 5/6, anti-citocheratina 14 ed anti-EGFR), delle mammelle normali e neoplastiche di cagna (sulle quali è stato standardizzato l'anticorpo anti-citocheratina 19), dei mastocitomi (sui quali è stato standardizzato l'anticorpo anti-CD117), dei carcinomi neuroendocrini (sui quali sono stati standardizzati gli anticorpi anti-enolasi specifica neuronale, anti-sinaptofisina ed anti-cromogranina), degli emangiosarcomi (sui quali è stato standardizzato l'anticorpo anti-fattore VIII della coagulazione) e dei versamenti pleurici (sui quali è stato standardizzato l'anticorpo anti-mesotelina). Per confermare le positività immunocitochimiche ottenute sono stati campionati, nella stessa sede, anche delle

porzioni degli stessi organi e tessuti da sottoporre all'esame immunoistochimico. Questi sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni dello spessore di 3µm. Nel caso dei versamenti, il preparato istologico è stato allestito dal liquido mediante la tecnica del citoincluso. La tecnica di citoinclusione è stata effettuata facendo precipitare le cellule in sospensione del fluido aggiungendo al campione dell'etanolo al 95%. Le cellule sono state poi concentrate tramite centrifugazione (3500rpm per 10 minuti), ed il pellet è stato fissato in formalina e trattato come il materiale per l'istologia.

2.1.2 Supporti

I preparati allestiti dai campioni di tessuto prelevati in sede necroscopica sono stati approntati su 2 tipi di vetro portaoggetto, uno normale da noi utilizzato routinariamente per la citologia (Superfrost, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) ed uno polarizzato (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany).

2.1.3 Allestimento

Tutti i preparati impiegati in fase di standardizzazione sono stati ottenuti tramite impronta del pezzo sul vetrino portaoggetto, striscio da ago aspirato o sedimento.

2.1.4 Fissazione

I preparati sono stati lasciati asciugare all'aria per il tempo necessario e poi sono stati divisi in 6 gruppi per ciascun campione. Ciascun gruppo è stato testato con un diverso fissativo, ad eccezione dell'ultimo, utilizzato come controllo, che non ha subito nessun tipo di fissazione.

I fissativi da noi testati durante la fase di standardizzazione della tecnica sono stati (Dalquen et al., 1993, Lung 1990, Flens et al., 1990):

-uno spray commerciale (Cytofix, BD Biosciences, San Jose, USA) che veniva applicato sui preparati tramite spruzzatura del prodotto sul vetrino,

- l'etanolo assoluto a 4°C che veniva applicato tramite immersione (per 10 minuti) dei preparati in una vaschetta contenente il fissativo,
- l'acetone a 4°C che veniva applicato tramite immersione (per 10 minuti) dei preparati in una vaschetta contenente il fissativo,
- il fissativo di Delaunay, ottenuto mescolando 500ml di etanolo al 99%, 500ml di acetone ed 1ml di acido tricloroacetico 1M, che veniva applicato tramite immersione (per 10 minuti) dei preparati in una vaschetta contenente il fissativo,
- la formalina (diluata al 10% tamponata con tampone fosfato a pH 7,2), che veniva applicata tramite immersione (per 10 minuti) dei preparati in una vaschetta contenente il fissativo.

2.1.5 Stoccaggio dei campioni

Tutti i vetri allestiti per la standardizzazione della tecnica sono stati stoccati a 4°C per un periodo di tempo inferiore alle 24 ore.

2.1.6 Inibizione delle perossidasi

Sono state testate 4 tipi diversi di inibizione delle perossidasi:

- 0,3% di perossido di idrogeno in acqua distillata,
- 3% di perossido di idrogeno in acqua distillata,
- 0,3% di perossido di idrogeno in metanolo assoluto,
- 3% di perossido di idrogeno in metanolo assoluto.

I preparati sono stati immersi nel liquido approntato per l'inibizione ed è stata testata l'efficacia delle varie soluzioni per periodi di immersione di 10, 20 e 30 minuti.

2.1.7 Reidratazione dei campioni

Dopo l'inibizione delle perossidasi, si è provveduto ad effettuare un passaggio di 10 minuti in TRIS prima dell'applicazione dell'anticorpo per ottenere la reidratazione del preparato. E' stata valutata, in questa sede, l'opportunità

dell'aggiungere al tampone un solvente quale il Triton X (Sigma, Steinheim, Germany) per favorire una più efficace penetrazione dell'anticorpo all'interno delle cellule.

2.1.8 Smascheramento antigenico

Nessuno dei campioni citologici testati con questa tecnica ha subito di una fase di smascheramento antigenico.

2.1.9 Pannello anticorpale

Gli anticorpi testati in fase di standardizzazione erano anticorpi commerciali monoclonali e policlonali.

Tabella 3: Anticorpi sui quali è stata effettuata la standardizzazione

Anticorpo		Produttore	Epitopo riconosciuto
AE1/AE3	M	DakoCytomation	PanCK
BA17	M	DakoCytomation	CK19
BBS/NC/VI-H14	M	DakoCytomation	NSE
D5/16B4	M	Zymed Laboratories	CK5/6
F7.2.38	M	DakoCytomation	CD3
HBME-1	M	DakoCytomation	MES
HM57	M	DakoCytomation	CD79 α
LL002	M	Thermo Fisher Scientific – Lab Vision Corp.	CK14
MAC387	M	DakoCytomation	MAC
MIB-1	M	DakoCytomation	Ki67
SY38	M	DakoCytomation	SYN
V9	M	DakoCytomation	VIM
111.6	M	Thermo Fisher Scientific – Lab Vision Corp.	EGFR
44F12	M	DiaPath	NCL-hTERT
Anti CD18can	M	Dott. Peter Moore – University of California	CD18 canino
Anti CD18Fel	M	Dott. Peter Moore – University of California	CD18 felino
Anti CD45RA	M	Dott. Peter Moore – University of California	CD45RA
Anti CD117	P	DakoCytomation	CD117
Anti CroA	P	DakoCytomation	CroA
Anti FVIII	P	DakoCytomation	FVIII
Anti LIS	P	DakoCytomation	LIS

M=Monoclonale

P=Policlonale

2.1.10 Metodi di incubazione

Tutti gli anticorpi sono stati testati tramite due tipi diversi di incubazione:

- Overnight a 4°C;
- 2 ore a 37°C

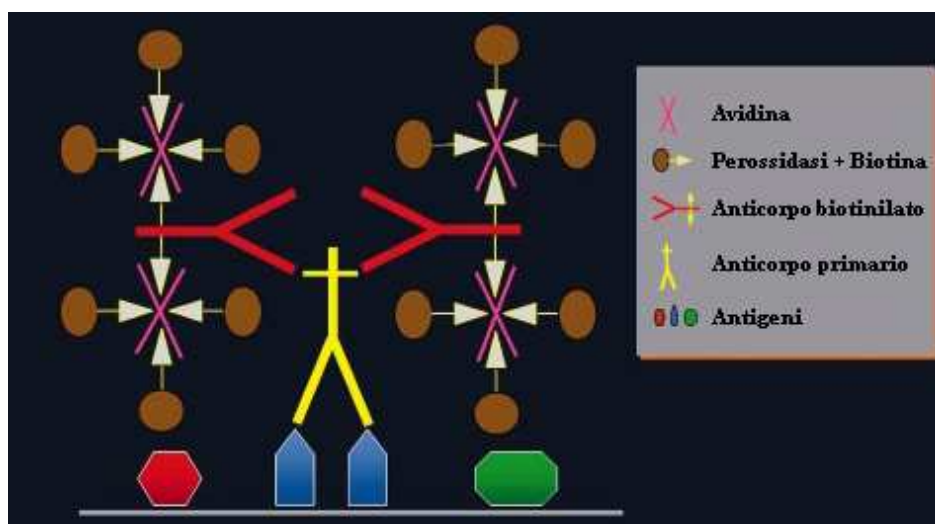
La tecnica di incubazione overnight è stata effettuata ponendo i vetri con l'anticorpo primario in frigorifero a 4°C all'interno di una camera umida, mentre l'incubazione a 37°C è stata effettuata ponendo la camera umida in una stufa termostata a temperatura costante.

2.1.11 Sistema di rivelazione

Dopo l'incubazione dell'anticorpo primario si è proceduto all'utilizzo di un sistema di rivelazione di tipo ABC o Biotina-Streptoavidina (Universal DakoCytomation LSAB+ System-HRP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) composto da un anticorpo secondario policlonale (anti-topo anti-coniglio ed anti-capra) biotinilato e da un complesso di streptoavidina legato a tre valenze di biotina ed a un enzima perossidasi. Entrambi i reagenti sono stati lasciati reagire in camera umida per 15 minuti a temperatura ambiente. Come cromogeno è stata usata la Diaminobenzidina (DAB), nella quale i preparati sono stati immersi per 10 minuti, affinché si sviluppasse una reazione cromatica della giusta intensità.

Tra un passaggio e l'altro sono stati effettuati dei lavaggi in tampone TRIS uso di 2 minuti.

Figura 1: Sistema di rivelazione ABC (Ramos-Vara, 2005)



2.1.12 Colorazione di contrasto e montaggio dei vetrini

Sono state testate 4 differenti colorazioni di contrasto al fine di individuare quella che permettesse una valutazione ottimale della positività immunocitochimica e che fornisse al contempo la maggior parte dei dati citomorfologici delle cellule esaminate.

Le colorazioni di contrasto sono state applicate tutte al termine della prova immunocitochimica, subito prima del montaggio in DPX.

Sono state impiegate le seguenti colorazioni:

- Eratossilina di Papanicolau: l'eratosilina di Papanicolau (Merck, Darmstadt, Germany) è stata applicata, previa diluizione 1:2, per immersione dei vetri in una vaschetta contenente il preparato. L'immersione viene protratta per un periodo variabile da 3 secondi ad un paio di minuti: tale variabile dipende da quanto tempo è passato dall'allestimento della soluzione che tende gradatamente a perdere le sue proprietà coloranti. Tutti i preparati ottenuti tramite citoinclusione, seguendo il protocollo previsto per l'immunoistochimica, sono stati contrastati esclusivamente con l'eratosilina di Papanicolau;

- Blu di Toluidina: il blu di toluidina (Merck, Darmstadt, Germany) è stato applicato, previa diluizione del prodotto allo 0,03%, per immersione dei vetri in una vaschetta contenente il preparato per 10 minuti. I vetri vengono quindi posti in acqua corrente di fonte fino a quando non viene rimosso l'eccesso di colorante, poi subiscono 2 immersioni da 1 minuto in etanolo al 95% e 2 immersioni da 1 minuto in etanolo al 100%;

- May Grünwald–Giemsa: la colorazione di May Grünwald–Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) è stata eseguita applicando la soluzione May-Grünwald per 3 minuti, effettuando un lavaggio con acqua distillata per 1 minuto ed infine applicando la soluzione Giemsa diluita ad 1 goccia/cc per 25 minuti;

- May Grünwald–Giemsa modificato: la colorazione standard di May Grünwald–Giemsa è stata da noi modificata per quanto riguarda i tempi di applicazione delle soluzioni al fine di ottenere un contrasto più tenue. Le modifiche sono state le seguenti: la soluzione May-Grünwald è stata applicata per 1 minuto e 20 secondi (invece dei 3 minuti) e la soluzione Giemsa diluita 1 goccia/cc è stata applicata per 5 minuti (invece dei 25 minuti)

Dopo l'applicazione della colorazione di contrasto tutti i vetri sono stati asciugati all'aria e si è proceduto al montaggio del vetro coprioggetto con DPX.

In alcuni preparati si è provveduto ad applicare la colorazione di contrasto prima di cominciare la prova immunocitochimica, al fine di osservare se tali colorazioni potessero essere in grado di inficiare la reazione anticorpale.

2.1.13 Controlli

Al fine di testare l'affidabilità della positività mostrata dalla metodica, gli anticorpi sono stati applicati su preparati ritenuti sicuramente positivi all'indagine per gli antigeni ricercati e confrontati, quando possibile, con i corrispettivi campioni immunoistochimici.

2.1.14 Valutazione della positività

La reazione è stata ritenuta positiva nel momento in cui le cellule apparivano colorate con un alone di membrana o citoplasmatico da giallo oro a bruno intenso. Tutti i risultati sono stati comparati alle valutazioni citologiche iniziali e, dove possibile, ai riscontri clinici ed ai risultati dell'istologia e dell'immunoistochimica eseguiti su campioni biotici o autotici, al fine di decidere in quali casi la positività risultasse attendibile ed in quali equivoca. I risultati sono stati valutati come attendibili quando confermati dalle diagnosi citologiche, istologiche ed immunoistochimiche precedenti e come equivoci nel caso in cui contrastassero con quelli forniti dalle altre tecniche.

2.2 Risultati

2.2.1 Campioni

Al termine della standardizzazione tutti i campioni utilizzati a questo fine sono stati ricontrollati con la metodica definitiva producendo le positività attese.

2.2.2 Supporti

L'osservazione condotta sui preparati allestiti sui due diversi supporti ha portato alla conclusione che i vetri non polarizzati Superfrost (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) risultano più adatti all'applicazione della metodica immunocitochimica, riuscendo a trattenere un maggior quantitativo di cellule rispetto a quelli polarizzati (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany).

2.2.3 Allestimento

Per quanto riguarda l'allestimento, non sono state individuate differenze nella risposta tra campioni preparati tramite striscio o impronta, tuttavia quest'ultima presenta l'indubbio vantaggio di permettere il rapido allestimento di più vetri una volta che la lesione da campionare è stata asportata e sezionata.

2.2.4 Fissazione

Durante la standardizzazione sono stati analizzati 5 differenti metodi di fissazione. Il primo è quello che prevede l'uso di uno spray commerciale (Cytifix, BD Biosciences, San Jose, USA). Questo è uno dei metodi di fissazione più comuni nella citologia ago-aspirativa, permette un'ottima conservazione della morfologia nucleare e previene il dilavamento delle cellule durante la colorazione. L'immunoreattività dei campioni così fissati è risultata, tuttavia, essere

decisamente flebile rispetto a quella ottenuta tramite altri fissativi. Inoltre, in letteratura (Dalquen et al., 1993) è riportato anche che i preparati così fissati sembrano perdere, nell'arco di pochi giorni, la loro reattività in maniera parziale o totale. Questo fa sì che gli spray siano sconsigliabili per il trasporto dei preparati, in quanto in grado di rendere i risultati del test poco attendibili.

Secondo alcuni autori (Dalquen et al., 1993; Judd et al., 1982) l'acetone, l'etanolo e le loro miscele sono i metodi di fissazione migliore per gli strisci destinati all'immunocitochimica.

I risultati ottenuti con l'etanolo assoluto a 4°C non sono stati soddisfacenti: nonostante la morfologia venga conservata in maniera ottimale, la reattività è risultata molto debole rispetto all'acetone puro.

Anche la miscela di acetone e metanolo (liquido di Delaunay), al momento di dimostrare la positività degli strisci, non ha dato risultati soddisfacenti, inoltre presenta il problema tecnico di mantenere le giuste proporzioni tra le due componenti liquide, cosa non facile perché sia l'acetone sia il metanolo sono prodotti estremamente volatili ma con una differente velocità di evaporazione.

La nostra esperienza ci ha condotti a scegliere l'acetone puro a 4°C in quanto, nonostante presenti il notevole svantaggio di danneggiare in maniera apprezzabile la morfologia, garantisce una buona reattività dei preparati così fissati.

Un'altra preparazione che ha offerto buoni risultati è stata la formalina. Si è però notata la tendenza dei preparati così fissati a mostrare un eccesso di positività e reattività aspecifiche.

L'ultima osservazione è stata effettuata sui preparati non fissati, da noi così preparati al fine di avere sia un controllo negativo interno sulle procedure di fissazione, sia un parametro di riferimento per la morfologia. Effettivamente non è stata ottenuta nessun tipo di reattività sugli strisci trattati in questo modo.

Figura 2: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione con Citofix. Le cellule marcate sono linfociti T (CD3) e macrofagi (MAC, VIM) di un linfonodo di cane (Ob. 40x).

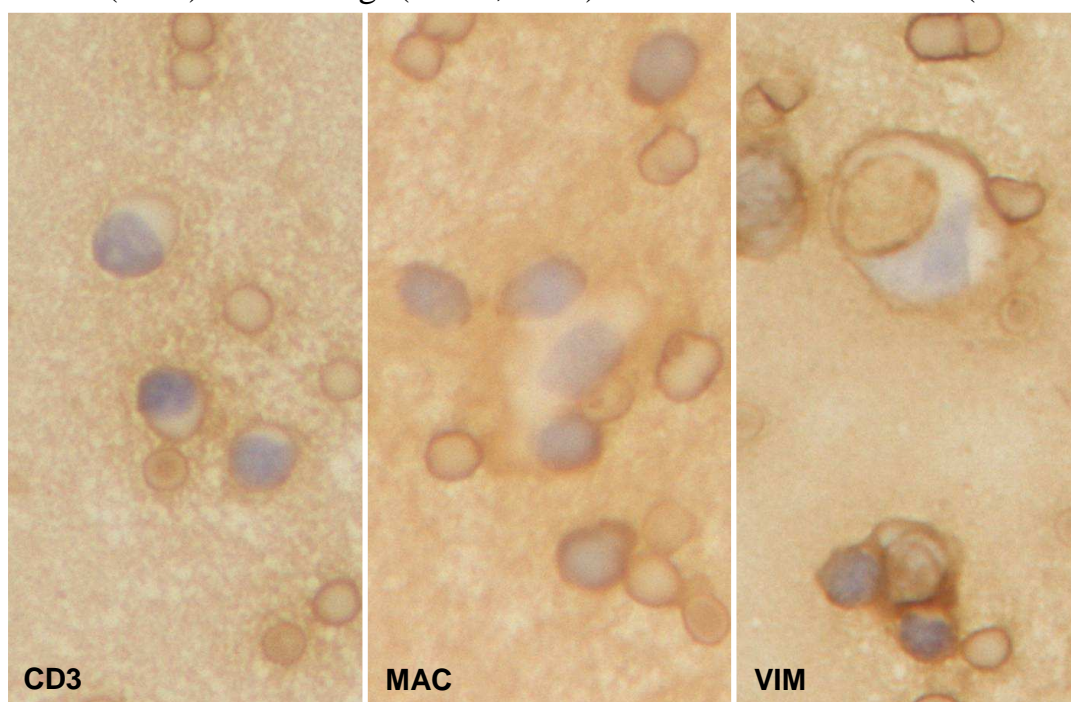


Figura 3: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione in etanolo assoluto a 4°C per 10 minuti. Le cellule marcate sono linfociti T (CD3) e macrofagi (MAC, VIM) di un linfonodo di cane (Ob. 40x).

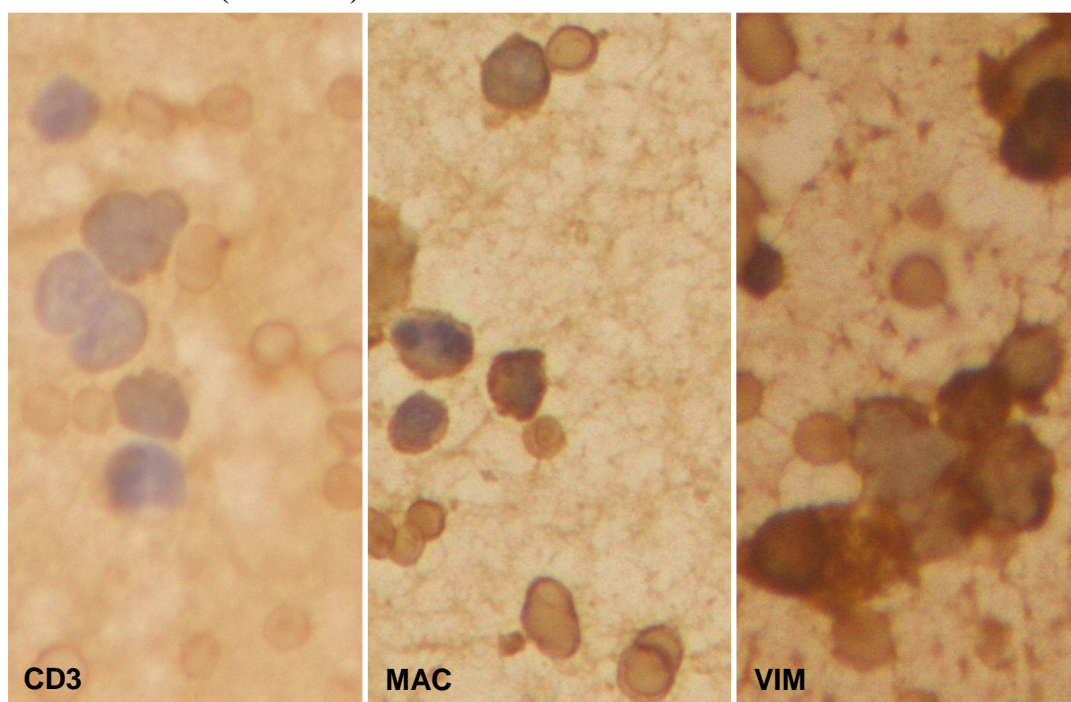


Figura 4: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione in acetone a 4°C per 10 minuti. Le cellule marcate sono linfociti T (CD3) e macrofagi (MAC, VIM) di un linfonodo di cane (Ob. 40x).

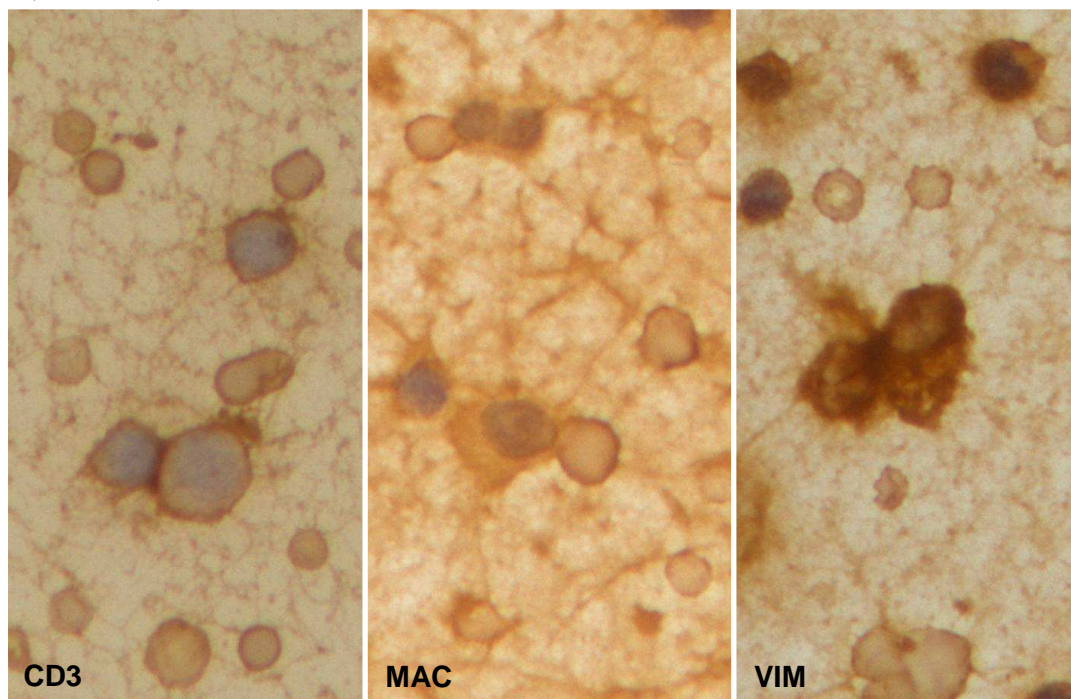


Figura 5: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione con fissativo di Delaunay per 10 minuti. Le cellule marcate sono linfociti T (CD3) e macrofagi (MAC, VIM) di un linfonodo di cane (Ob. 40x).

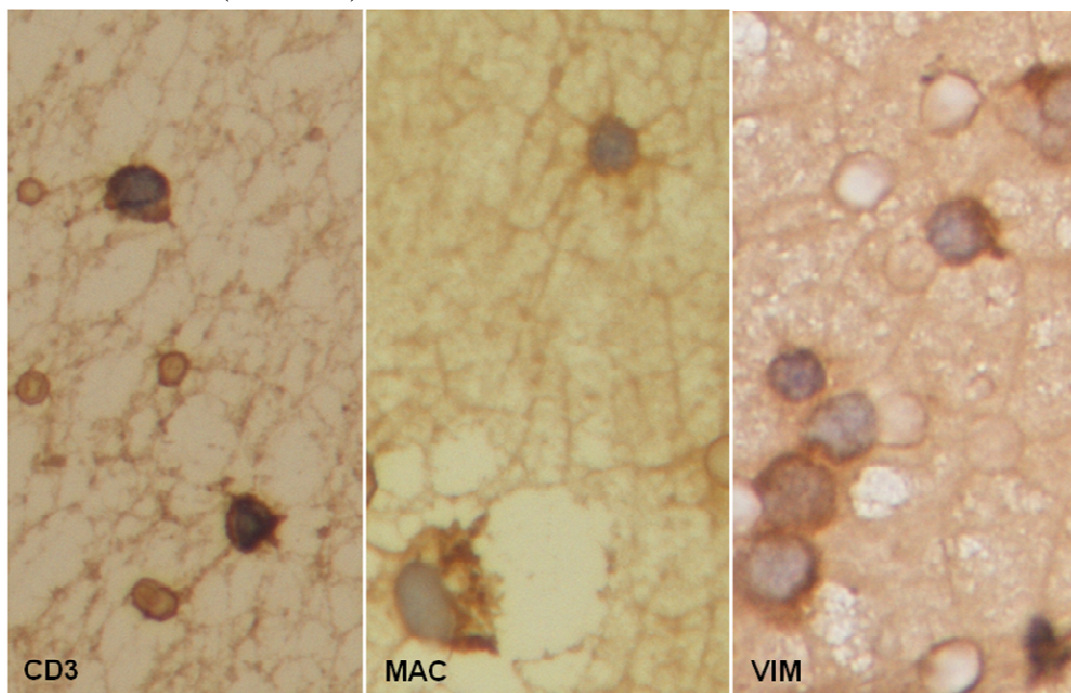


Figura 6: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione in formalina per 10 minuti. Le cellule marcate sono linfociti T (CD3) e macrofagi (MAC, VIM) di un linfonodo di cane (Ob. 40x).

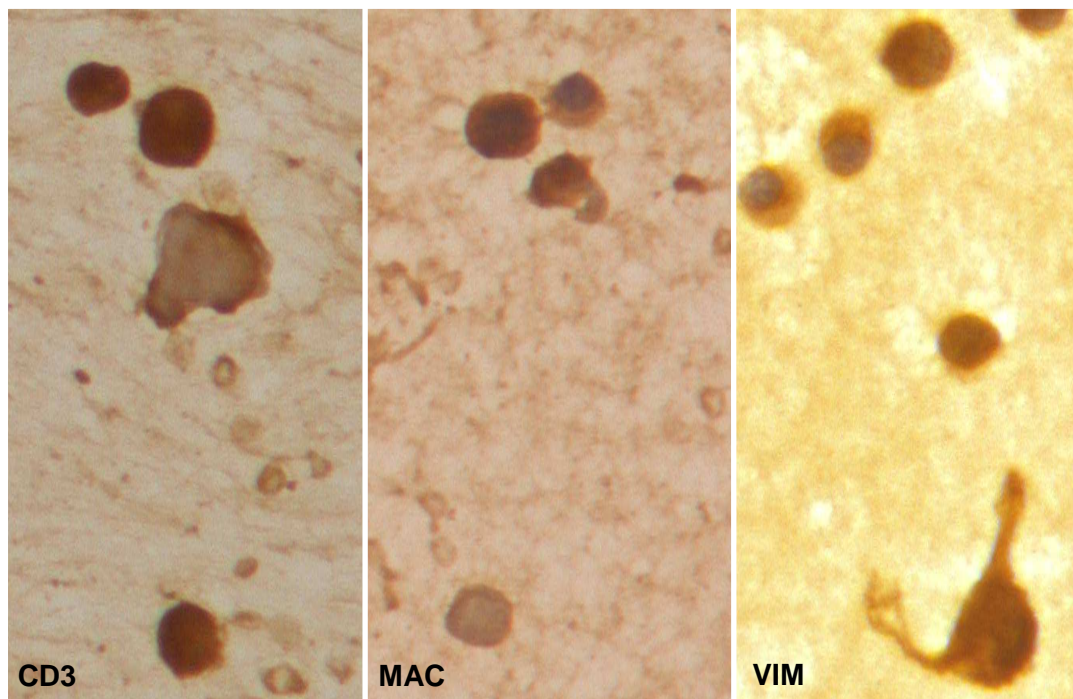
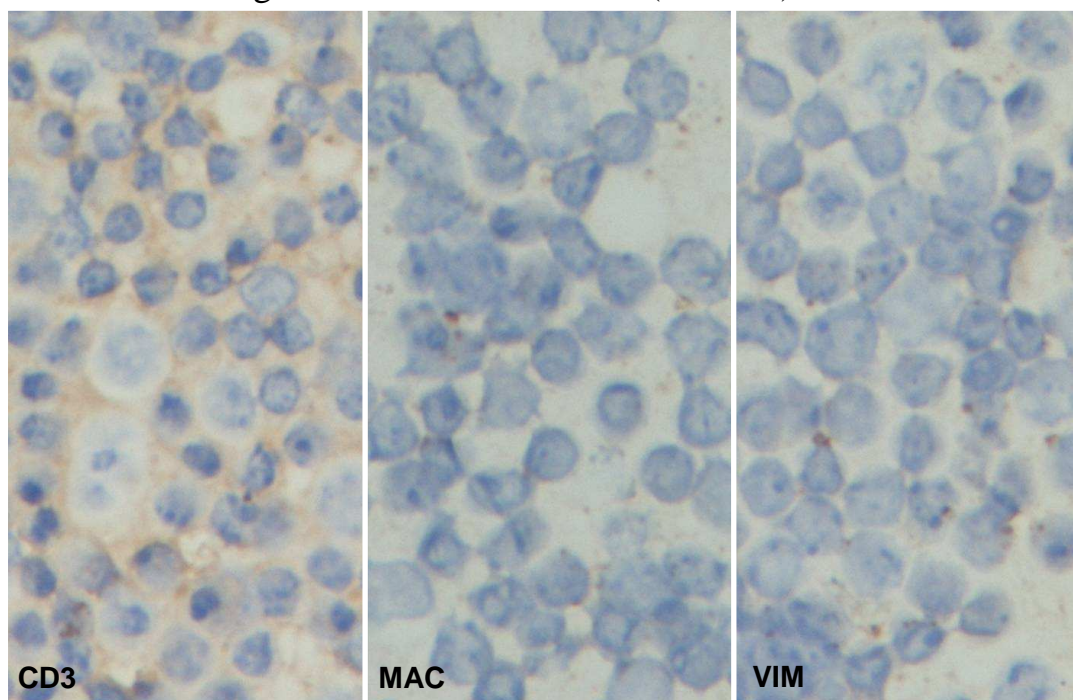


Figura 7: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione all'aria. Le cellule raffigurate sono linfociti T e macrofagi di un linfonodo di cane (Ob. 40x).



2.2.5 Stoccaggio dei campioni

E' stato possibile evidenziare come lo stoccaggio dei campioni, per i tempi brevi della standardizzazione, non abbia minimamente influito sulla reattività dei preparati.

2.2.6 Inibizione delle perossidasi

Le prove effettuate per trovare quale tecnica per l'inibizione delle perossidasi fosse la più efficace hanno condotto alla scelta dell'inibizione tramite immersione dei preparati in metanolo assoluto con l'aggiunta di perossido di idrogeno al 3 %, in quanto le soluzioni allo 0,3% di perossido di idrogeno in metanolo e le soluzioni in acqua distillata non bloccavano le positività aspecifiche legate alle perossidasi.

Sono stati individuati come tempo ottimale di immersione 10 minuti, in quanto periodi di immersione più lunghi conducevano al dilavamento delle cellule.

2.2.7 Reidratazione dei campioni

E' stato messo in luce, in questo passaggio, che l'aggiunta di un solvente quale il Triton X (Sigma, Steinheim, Germany) al fine di favorire una più efficace penetrazione dell'anticorpo all'interno delle cellule sia superflua. Dato però che l'utilizzo di tale componente risulta estremamente scomodo per via delle sue caratteristiche fisiche e della sua pericolosità (irritante e tossico-nocivo) si è optato per eliminarlo dal protocollo.

2.2.8 Smascheramento antigenico

Nessuno dei campioni allestiti tramite striscio o impronta ha subito una fase di smascheramento antigenico.

2.2.9 Pannello anticorpale

In fase di standardizzazione è stato possibile ottenere la positività di tutti gli anticorpi testati ad eccezione di quelli specifici per i markers nucleari (Ki67 e telomerasi).

In particolare:

- gli anticorpi per la rivelazione della pancitocheratina, delle citocheratine 5/6, 14 e 19 hanno dimostrato la presenza di queste molecole mostrando la positività a livello di citoplasma delle cellule epiteliali, mentre quello anti-EGFR ha fornito una positività di membrana;
- gli anticorpi anti-CD3, anti-CD45RA e anti-CD79 α hanno evidenziato la presenza delle porzioni citoplasmatiche di queste molecole di superficie, proprie dei linfociti T (CD3) e B (CD79 α e CD45RA), nel citoplasma dei linfociti presenti nei preparati allestiti da linfonodo;
- gli anticorpi specifici per l'antigene comune mielo-istiocitario, il lisozima, il CD18 canino e felino e la vimentina hanno marcato efficacemente il citoplasma dei macrofagi sinusali dei linfonodi;
- l'enolasi neuronale specifica (NSE), la sinaptofisina (SYN) e la cromogranina A (CroA) sono state correttamente evidenziate dai loro anticorpi specifici a livello di citoplasma delle cellule di carcinoma neuroendocrino;
- l'anticorpo anti-CD117 ha marcato il recettore KIT mostrando una positività diffusa a livello di citoplasma delle cellule del mastocitoma utilizzato per la standardizzazione, positività che è stata poi confermata dall'immunoistochimica;
- l'anticorpo per la rivelazione del fattore VIII^o della coagulazione si è legato correttamente alla proteina contenuta nel citoplasma delle cellule di emangiosarcoma;
- l'anticorpo anti-mesotelina ha dimostrato l'espressione di questa proteina nel citoplasma delle cellule mesoteliali contenute nei versamenti da noi testati.

Tabella 4: Localizzazione della positività degli anticorpi indagati nelle cellule dei preparati

Epitopo specifico	Tipo di positività	Cellule marcate
CD3	Citoplasmatica	Linfociti T
CD18 canino	Citoplasmatica	Macrofagi
CD18 felino	Citoplasmatica	Macrofagi
CD45RA	Citoplasmatica	Linfociti B
CD79 α	Citoplasmatica	Linfociti B
CD117	Citoplasmatica	Mastociti neoplastici
CK5/6	Citoplasmatica	Cellule epiteliali
CK14	Citoplasmatica	Cellule epiteliali
CK19	Citoplasmatica	Cellule epiteliali
CroA	Citoplasmatica	Cellule tumorali neuroendocrine
EGFR	Membrana	Cellule epiteliali
FVIII	Citoplasmatica	Cellule tumorali di
LIS	Citoplasmatica	emangiosarcoma
MAC	Citoplasmatica	Macrofagi
MES	Citoplasmatica	Macrofagi
NSE	Citoplasmatica	Cellule mesoteliali
PanCK	Citoplasmatica	Cellule tumorali neuroendocrine
SYN	Citoplasmatica	Cellule epiteliali
VIM	Citoplasmatica	Cellule tumorali neuroendocrine Macrofagi

2.2.10 Metodi di incubazione

I metodi di incubazione testati sono stati quello overnight e quello per 2 ore in stufa a 37°C. La tecnica di incubazione overnight ha permesso di ottenere preparati di maggior qualità, in quanto i vetri incubati con questa metodica presentano generalmente un'aspecificità di fondo totalmente assente o molto meno evidente rispetto all'incubazione a 37°C. L'incubazione a 37°C, effettuata in stufa termostata, presenta invece il vantaggio di permettere la lettura dei risultati della prova immunocitochimica in giornata, a scapito però della qualità del preparato. L'unica eccezione riscontrata a questa regola è stata l'anticorpo anti-EGFR che ha dato risultati decisamente migliori quando incubato in stufa.

2.2.11 Sistema di rivelazione

Il sistema di rivelazione Biotina-Streptoavidina (Universal DakoCytomation LSAB+ System-HRP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), utilizzato routinariamente nel nostro laboratorio di immunoistochimica, è risultato efficace anche nell'indagine immunocitochimica in quanto le positività dei preparati risultavano abbastanza sensibili e specifiche.

2.2.12 Colorazione di contrasto e montaggio dei vetrini

Al fine di individuare una colorazione di contrasto che permettesse una valutazione ottimale della positività immunocitochimica e che fornisse al contempo la maggior parte dei dati citomorfologici delle cellule esaminate., sono state testate l'ematossilina di Papanicolau, il Blu di Toluidina il May Grünwald–Giemsa ed un May Grünwald–Giemsa modificato.

L'Ematossilina di Papanicolau non ha mostrato interferenze di alcun tipo al momento della lettura del preparato, tuttavia la sua colorazione monocromatica presenta il notevole limite di rendere estremamente difficoltoso il riconoscimento del tipo cellulare negli strisci in cui il pool di cellule presenti è piuttosto vario.

Il Blu di Toluidina è stato testato per tentare di svelare la metacromasia nei campioni di mastocitoma, tuttavia i tempi di colorazione risultavano estremamente lunghi. La tecnica era effettivamente efficace per evidenziare la metacromasia, ma poco adeguata per colorare le cellule prive di questa particolare caratteristica.

I risultati più soddisfacenti sono stati ottenuti con l'applicazione della colorazione di May Grünwald – Giemsa che permetteva sia di distinguere in maniera ottimale le caratteristiche citologiche sia di evidenziare l'eventuale metacromasia delle cellule colorate. Inizialmente la tecnica classica descritta in tutti i protocolli citologici di routine presentava lo svantaggio di sovracolorare i citoplasmi coprendo così la positività delle cellule reattive, tuttavia è stato possibile metterne a punto una versione dai toni meno intensi che ha garantito una corretta lettura ed interpretazione dei risultati senza perdere i vantaggi sopra descritti. Tutte le colorazioni applicate al termine della procedura immunocitochimica non hanno alterato in alcun modo la positività ottenuta.

Nei preparati sui quali si era provveduto ad applicare la colorazione di contrasto prima di cominciare la prova immunocitochimica si è riusciti ad evidenziare la positività delle cellule agli anticorpi testati raddoppiando la concentrazione degli anticorpi stessi, tuttavia la positività così ottenuta è risultata apprezzabilmente più debole rispetto a quella ottenuta con la sola colorazione di contrasto applicata a fine prova. Questo inconveniente potrebbe essere imputabile al fatto che gli epitopi vengono parzialmente danneggiati dalla colorazione di contrasto (Dalquen et al., 1993); il che ci induce a sconsigliare delle valutazioni di tipo qualitativo (es: valutazione del KIT pattern) basate su preparati già colorati.

2.2.13 Controlli

Al fine di testare l'affidabilità della positività mostrata dalla metodica, gli anticorpi sono stati applicati su preparati ritenuti sicuramente positivi all'indagine per gli antigeni ricercati e confrontati, quando possibile, con i corrispettivi campioni immunoistochimici.

Le positività ottenute sono risultate pertinenti sia per il tipo cellulare marcato che per la localizzazione all'interno delle cellule. Il confronto con l'immunoistochimica ha provveduto a garantire le reazioni testate sui campioni neoplastici.

2.3 Discussione

Lo scopo di questa prima fase di standardizzazione era quello di ottenere una tecnica immunocitochimica che permettesse di ottenere dei preparati nei quali era presente una positività chiara ed indubbia ed al contempo mantenessero le condizioni ideali per la lettura e l'interpretazione del quadro patologico rappresentato. Per raggiungere questo risultato è stato necessario valutare e superare una serie di ostacoli tecnici e procedurali, a partire dal metodo di fissazione da applicare ai preparati.

Dal momento che la fissazione può alterare gli epitopi, i suoi effetti sulla immunoreattività dei campioni devono essere testati prima dell'inserimento degli anticorpi all'interno di un protocollo diagnostico. Sono pochi gli studi che si sono focalizzati su questo aspetto (Dinges et al., 1989; Judd et al., 1982; Li et al., 1987; St.-Laurent et al., 2006; Van Ewijk et al., 1983). La maggior parte di queste informazioni devono essere estrapolate invece dai materiali e metodi di lavori riguardanti specifici quesiti diagnostici. La letteratura suggerisce e propone un'ampia gamma di possibili fissativi tuttavia, dopo aver testato sei diverse possibili soluzioni, la nostra esperienza ci ha portati a scegliere l'acetone a 4°C come fissativo di elezione grazie alla sua maggiore praticità ed alla conservazione di una buona reattività del campione.

Nonostante nell'ambito delle indagini immunoistochimiche esistano e vengano applicate svariate tecniche di inibizione delle perossidasi, applicate in maniera specifica ad ogni singolo anticorpo, ci si è accorti come nelle nostre prove immunocitochimiche la reattività ottimale (degli anticorpi che risultavano reattivi) era ottenibile sempre con l'inibizione effettuata in metanolo assoluto con l'aggiunta di perossido di idrogeno al 3%.

Tutti gli anticorpi citoplasmatici testati in questa fase hanno fornito positività chiare e pertinenti, mentre invece quelli per gli antigeni nucleari non hanno reagito in nessun modo con gli antigeni specifici. Questo fatto potrebbe essere legato ad una difficoltà degli anticorpi a superare la membrana nucleare.

I metodi di incubazione testati sono stati quello overnight e quello per 2 ore in stufa a 37°C. La tecnica di incubazione overnight ha permesso di ottenere preparati di maggior qualità, in quanto i vetri incubati con questa metodica presentano generalmente un'aspecificità di fondo totalmente assente o molto meno evidente rispetto all'incubazione a 37°C. Si è supposto che questo fenomeno sia legato ad

una eccessiva evaporazione del tampone usato per diluire l'anticorpo ed a una conseguente "deposizione" dell'anticorpo stesso sul fondo del vetrino.

Uno studio di Chess et al. (1986) riporta la presenza di una colorazione di fondo nel 20% dei preparati. Nella nostra casistica il problema è stato molto più contenuto, probabilmente grazie al sistema di rivelazione di tipo Biotina-Streptoavidina che è molto specifico.

L'applicazione della nostra particolare colorazione di contrasto, il May Grünwald-Giemsa modificato, ha permesso di risolvere in maniera adeguata il problema della difficoltà di individuazione delle cellule diagnostiche all'interno di una popolazione cellulare mista. Essa infatti è in grado di fornire una grande quantità di dettagli nucleari e citoplasmatici, decisamente superiore a quelli forniti dall'ematossilina di Papanicolau e dal Blu di Toluidina, senza mascherare o coprire la positività ottenuta, come succede utilizzando colorazioni di contrasto dai toni più intensi come il May Grünwald-Giemsa normale.

2.4 Conclusioni

Al termine del periodo di standardizzazione abbiamo ottenuto una tecnica in grado di fornire delle positività chiare e pertinenti agli anticorpi di interesse diagnostico da noi testati. Inoltre, grazie alla colorazione di contrasto particolare, i preparati ottenuti sono in grado di fornire utili indicazioni citomorfologiche.

La tecnica da noi ritenuta più efficace è descritta nel seguente protocollo:

- fissazione per 10 minuti in acetone refrigerato a 4°C;
- conservazione dei preparati non colorati in frigorifero a 4°C qualora non sia possibile procedere immediatamente alla colorazione immunocitochimica;
- inibizione delle perossidasi endogene per 10 minuti in metanolo con perossido di idrogeno al 3%;
- reidratazione in tampone TRIS per 10 minuti;
- incubazione overnight a 4°C in camera umida con anticorpo;
- lavaggio in TRIS (2 minuti);
- incubazione con anticorpo secondario (IgG antirabbit biotinilato) 15 minuti;
- lavaggio in TRIS (2 minuti);
- incubazione in streptoavidina-perossidasi per 15 minuti;
- lavaggio in TRIS (2 minuti);
- rivelazione in Diaminobenzidina (DAB) per 10 minuti;
- lavaggio in TRIS (2 minuti);
- lavaggio in acqua distillata (2 minuti);
- colorazione di contrasto con May-Grünwald–Giemsa modificato (soluzione May-Grünwald applicata per 1 minuto e 20 secondi, lavaggio in acqua distillata per 1 minuto, soluzione Giemsa diluita 1 goccia/cc applicata per 5 minuti);
- montaggio in DPX.

La tecnica immunocitochimica da noi messa a punto fornisce delle risposte in maniera molto più rapida della controparte istologica, il che valorizza uno dei maggiori punti di forza della citologia, e si adatta particolarmente bene alla situazione del laboratorio di immunoistochimica, il che permette di adottarla senza grossi sconvolgimenti nella routine del laboratorio stesso.

3. APPLICAZIONE DELLA TECNICA IMMUNOCITOCHIMICA AI PREPARATI CITOLOGICI

Terminata la standardizzazione della metodica, si è proceduto all'applicazione della tecnica alla citologia di routine, in modo da fornire un ausilio immunologico a tale tipo di indagine e da aumentarne quindi il potere diagnostico.

3.1 Materiali e Metodi

3.1.1 Campioni

La tecnica immunocitochimica è stata applicata su 87 preparati citologici prelevati da vari organi e tessuti di cani e gatti.

I prelievi sono stati effettuati sia su animali vivi sia in sede necroscopica, post-mortem.

3.1.2 Allestimento

I preparati che sono stati testati erano stati allestiti tramite i metodi più svariati.

Oltre agli strisci eseguiti mediante ago-aspirazione e alle impronte ottenute da materiale fresco, sono pervenuti anche un campione di coltura cellulare e dei versamenti.

Il materiale del versamento non è normalmente utilizzabile per un allestimento o un test immunocitochimico senza effettuare prima alcune tecniche preparatorie:

- laddove sia presente del liquido poco cellulare, si può procedere a concentrare le cellule tramite centrifugazione in modo da ottenere un campione utilizzabile;
- qualora sia disponibile solo una modica quantità di liquido, la tecnica del citospin risulta utile per concentrare le poche cellule in una piccola porzione del vetro. La tecnica del citospin è stata da noi effettuata tramite l'impiego di una citocentrifuga (Cytospin 3, Shandon, USA) a 1000rpm per 10 minuti. In letteratura è suggerito e descritto l'uso di tale tecnica per recuperare le cellule dall'interno dell'ago utilizzato per l'agoaspirazione (Dalquen et al., 1993, Brown et al., 1989;

Kung et al., 1990), ma nel nostro laboratorio non si è mai proceduto ad applicarla a tal fine.

3.1.3 Fissazione

I preparati sono stati lasciati asciugare all'aria per il tempo necessario e poi sono stati fissati in acetone a 4°C, che veniva applicato tramite immersione (per 10 minuti) dei preparati in una vaschetta contenente il fissativo.

3.1.4 Stoccaggio dei campioni

Tutti i vetri allestiti per le colorazioni immunocitochimiche sono stati stoccati routinariamente a 4°C per un periodo di tempo che è variato da pochi giorni a 8 mesi.

3.1.5 Tecniche preparatorie particolari

Talvolta il materiale inviato non era normalmente utilizzabile per un allestimento o un test immunocitochimico senza effettuare prima alcune tecniche preparatorie. È stato necessario, ad esempio, quando erano presenti un numero esiguo di campioni da testare, ricorrere all'uso di una DakoCytomation Pen (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) per creare dei cerchi di liquido idrorepellente sulla superficie del vetro portaoggetto, in modo da poter testare più anticorpi su un singolo striscio.

3.1.6 Inibizione delle perossidasi

Tutti i preparati analizzati, ad eccezione di quelli allestiti tramite citoinclusione, hanno subito un'inibizione delle perossidasi endogene tramite immersione, per 10 minuti, in metanolo con di perossido di idrogeno al 3%.

3.1.7 Reidratazione dei campioni

Dopo l'inibizione delle perossidasi, si è provveduto ad effettuare un passaggio di 10 minuti in TRIS prima dell'applicazione dell'anticorpo per ottenere la reidratazione del preparato.

3.1.8 Pannello anticorpale

La maggior parte degli anticorpi utilizzati routinariamente dal nostro laboratorio di immunoistochimica ed immunocitochimica sono anticorpi commerciali monoclonali e policlonali.

Gli anticorpi utilizzati nelle nostre indagini immunocitochimiche sono riportati nella Tabella 5

Tabella 5: Anticorpi utilizzati nelle indagini immunocitochimiche

Anticorpo		Produttore	Epitopo riconosciuto
AE1/AE3	M	DakoCytomation	PanCK
BA17	M	DakoCytomation	CK19
BBS/NC/VI-H14	M	DakoCytomation	NSE
D5/16B4	M	Zymed Laboratories	CK5/6
F7.2.38	M	DakoCytomation	CD3
HBME-1	M	DakoCytomation	MES
HM57	M	DakoCytomation	CD79 α
LL002	M	Thermo Fisher Scientific – Lab Vision Corp.	CK14
MAC387	M	DakoCytomation	MAC
SY38	M	DakoCytomation	SYN
V9	M	DakoCytomation	VIM
111.6	M	Thermo Fisher Scientific – Lab Vision Corp.	EGFR
Anti CD18can	M	Dott. Peter Moore – University of California	CD18 canino
Anti CD18Fel	M	Dott. Peter Moore – University of California	CD18 felino
Anti CD45RA	M	Dott. Peter Moore – University of California	CD45RA
Anti CD117	P	DakoCytomation	CD117
Anti CroA	P	DakoCytomation	CroA
Anti FVIII	P	DakoCytomation	FVIII
Anti LIS	P	DakoCytomation	LIS

M=Monoclonale

P=Policlonale

Il pannello anticorpale applicato è stato scelto, di volta in volta, in base alle indicazioni ed i sospetti del patologo.

3.1.9 Metodi di incubazione

Tutti gli anticorpi, ad eccezione del 111.6 (anti-EGFR) sono stati incubati overnight a 4°C. L'incubazione è stata effettuata ponendo i vetri con l'anticorpo primario in frigorifero all'interno di una camera umida.

L'anticorpo anti-EGFR è stato incubato invece per 2 ore a 37°C, ponendo la camera umida in una stufa termostata a temperatura costante.

3.1.10 Sistema di rivelazione

Dopo l'incubazione dell'anticorpo primario si è proceduto, in tutti i tipi di campione, all'utilizzo di un sistema di rivelazione di tipo ABC o Biotina-Streptoavidina (Universal DakoCytomation LSAB+ System-HRP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) composto da un anticorpo secondario policlonale (anti-topo anti-coniglio ed anti-capra) biotinilato e da un complesso di streptoavidina legato a tre valenze di biotina ed a un enzima perossidasi. Entrambi i reagenti sono stati lasciati reagire in camera umida per 15 minuti a temperatura ambiente. Come cromogeno è stata usata la Diaminobenzidina (DAB), nella quale i preparati sono stati immersi per 10 minuti, affinché si sviluppasse una reazione cromatica della giusta intensità.

Tra tutti questi passaggi sono stati effettuati dei lavaggi di 2 minuti in tampone TRIS.

3.1.11 Colorazione di contrasto e montaggio dei vetrini

Tutti i preparati sono stati colorati con la colorazione di May Grünwald–Giemsa modificata.

Il protocollo di questa colorazione è così descritto:

- May Grünwald (tal quale) per 1 minuto e 20 secondi;

- Lavaggio con acqua distillata per 1 minuto;
- Giemsa (diluito in acqua distillata ad una goccia per millilitro) per 5 minuti;
- Lavaggio con acqua distillata;
- Asciugatura all'aria

Dopo l'applicazione della colorazione di contrasto si è proceduto al montaggio del vetro coprioggetto con DPX.

3.1.12 Controlli

Le reazioni immunocitochimiche sono state controllate, dove possibile, tramite l'inserimento di controlli positivi interni. Purtroppo non è stato sempre possibile avere dei campioni immunoreattivi per tutti gli anticorpi da testare e, oltretutto, non è mai stato possibile inserire dei controlli interni (tampone PBS senza anticorpo) o dei controlli negativi (inserimento di siero immune non specifico) a causa della limitata quantità di campione che veniva inviata per l'analisi. Dove possibile, la reattività del campione veniva testata anche tramite l'inserimento, all'interno del pannello anticorpale, di alcuni anticorpi la cui positività all'interno del campione fosse al di là di ogni possibile dubbio.

3.1.13 Valutazione della positività

La reazione è stata ritenuta positiva nel momento in cui le cellule apparivano colorate con un alone di membrana o citoplasmatico da giallo oro a bruno intenso. Tutti i risultati sono stati comparati alle valutazioni citologiche iniziali e, dove possibile, ai riscontri clinici ed ai risultati dell'istologia e dell'immunoistochimica eseguiti su campioni biotici o autotici, al fine di decidere in quali casi la positività risultasse diagnostica, confermativa o equivoca. I risultati sono stati valutati come diagnostici nei casi in cui era possibile raggiungere la diagnosi esclusivamente attraverso l'immunocitochimica, come confermativi se la tecnica si limitava a confermare le diagnosi citologiche o istologiche precedenti e come equivoci nel caso in cui contrastassero con quelli forniti dalle altre tecniche.

Nel caso dell'applicazione della metodica al fine di valutare dei markers prognostici sono stati seguiti i criteri proposti da Kiupel (Kiupel et al., 2004) e Webster (Webster et al. 2006) per assegnare i pattern di colorazione. Tali criteri sono esposti per esteso nel capitolo dedicato al mastocitoma.

3. 2 Risultati

3.2.1 Campioni

Tra gennaio 2006 e dicembre 2008 i test immunocitochimici sono stati eseguiti su 87 degli 893 casi su cui era stato effettuato un campionamento di tipo citologico (il 9,74%). Il 75,86% dei campioni testati erano stati prelevati tramite agoaspirazione, la restante parte era stata ottenuta tramite impronta della lesione sul vetrino o centrifugazione, citospin o citoinclusione da un versamento. In un singolo caso era pervenuto un preparato da coltura cellulare.

Tabella 6: Campioni utilizzati per i test immunocitochimici

Campioni	n°
Ago aspirato	66
Coltura cellulare	1
Impronta dalla lesione	11
Versamento	9
TOTALE	87

Il test immunocitochimico è stato eseguito su 30 casi al fine di ottenere la tipizzazione della lesione neoplastica campionata (34,48% dei casi), su 51 casi per rendere possibile la valutazione dell'espressione di alcuni markers prognostici (58,62% dei casi), su 5 casi per poter differenziare delle sospette lesioni reattive da lesioni neoplastiche (5,75% dei casi) e su un unico caso (1,15%) per valutare il tipo di espressione del recettore KIT in una mastocitosi cutanea.

Tabella 7: Indicazioni per l'uso dei test immunocitochimici sui preparati citologici

Campioni	n°
Distinzione tra tumore e lesione reattiva	5
Tipizzazione di un tumore	30
Valutazione di markers prognostici	51
Altro	1
TOTALE	87

3.2.2 Stoccaggio dei campioni

Tutti i vetri allestiti per le colorazioni immunocitochimiche sono stati stoccati routinariamente a 4°C.

È stato possibile ottenere una reazione positiva chiara dai casi stoccati per un periodo di tempo variabile a seconda dell'antigene preso in considerazione: il recettore KIT è rimasto immunoreattivo per più di 8 mesi, prima che il campione a nostra disposizione si esaurisse, mentre altri antigeni quali le pancitocheratine, le citocheratine 5/6, 14 e 19, la vimentina e la mesotelina sono rimaste chiaramente dimostrabili nei nostri preparati per circa 6 mesi.

L'immunoreattività del materiale fissato in acetone è stata dimostrata anche nei campioni conservati a temperatura ambiente per qualche giorno.

3.2.3 Tecniche preparatorie particolari

Quando perveniva un numero troppo esiguo di campioni da testare si è ricorso all'uso di una DakoCytomation Pen (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) per creare dei cerchi di liquido idrorepellente sulla superficie del vetro portaoggetto, in modo da poter creare delle zone testabili separate tra loro all'interno di un singolo striscio. Per quanto utile, questa tecnica preparatoria risulta poco pratica a causa:

- delle precauzioni che devono essere impiegate per la sicurezza dell'operatore che usa la DakoCytomation Pen. Questa infatti ha componenti tossiche e cancerogene per contatto ed inalazione, per cui tutto il lavoro deve essere svolto sotto cappa utilizzando guanti in nitrile;
- dei rischi legati ad un uso scorretto della DakoCytomation Pen, che potrebbero rendere il campione inutilizzabile;
- dell'impossibilità di applicare questa metodica su campioni in cui la distribuzione delle cellule utili alla diagnosi non sia uniforme.

3.2.4 Pannello anticorpale

Il pannello anticorpale applicato è stato scelto, di volta in volta, in base alle indicazioni e ai sospetti del patologo.

Sono state riscontrate 3 indicazioni principali che hanno giustificato l'uso dell'immunocitochimica:

1. Distinzione tra stati reattivi e neoplasie nei casi di versamento pleurico;
2. Tipizzazione delle neoplasie,
3. Valutazione dell'espressione di alcuni markers di importante significato prognostico e terapeutico tipici di determinate neoplasie:
 - a. CD117 (KIT) nei mastocitomi;
 - b. EGFR nei carcinomi.

L'applicazione dell'immunocitochimica al fine di differenziare gli stati reattivi da delle neoplasie è stata richiesta nel momento in cui la citologia evidenziava la presenza di atipie in preparati ottenuti da versamento.

L'immunocitochimica è stata applicata alla tipizzazione dei tumori nel momento in cui la diagnosi citologica risultava incerta sull'origine della neoplasia esaminata.

La rivelazione dei markers a fini prognostici è stata applicata sui mastocitomi (a) e sui carcinomi di gatto (b) al fine di dimostrare ed esaminare la presenza e la ripartizione dei recettori tirosinchinasici CD117 (KIT) ed EGFR che presentano un ruolo importante nella progressione di questi stessi tumori.

Tabella 8: Epitopi valutati nella distinzione tra versamenti di natura reattiva o neoplastica; nella tipizzazione delle neoplasie e markers prognostici ricercati

Indicazione	Epitopi ricercati
Lesione reattiva/Neoplasia <ul style="list-style-type: none"> • Versamenti 	CK5/6, CK19, LIS, MAC, MES, PanCK, VIM
Tipizzazione delle neoplasie <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma • Carcinoma neuroendocrino • Disordini istiocitari • Infiltrazione leucemica mieloide/linfoide • Linfoma • Sarcoma 	CK5/6, CK14, CK19, PanCK, VIM CK14, CK19, CroA, NSE, PanCK, SYN CD3, CD79 α , CD117, LIS, MAC, MES, PanCK, VIM CD3, CD79 α , LIS, MAC CD3, CD45RA, CD79 α CD117, FVIII, PanCK, VIM
Markers prognostici valutati <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma • Mastocitoma 	EGFR CD117

Figura 8: Reattività dell'anticorpo anti-pancitocheratina (PanCK). Reazione positiva delle cellule epiteliali di un carcinoma squanocellulare di gatto (+), reazione negativa delle cellule appartenenti ad un sarcoma istiocitario di cane (-) e confronto con l'istologia dello stesso carcinoma di gatto rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

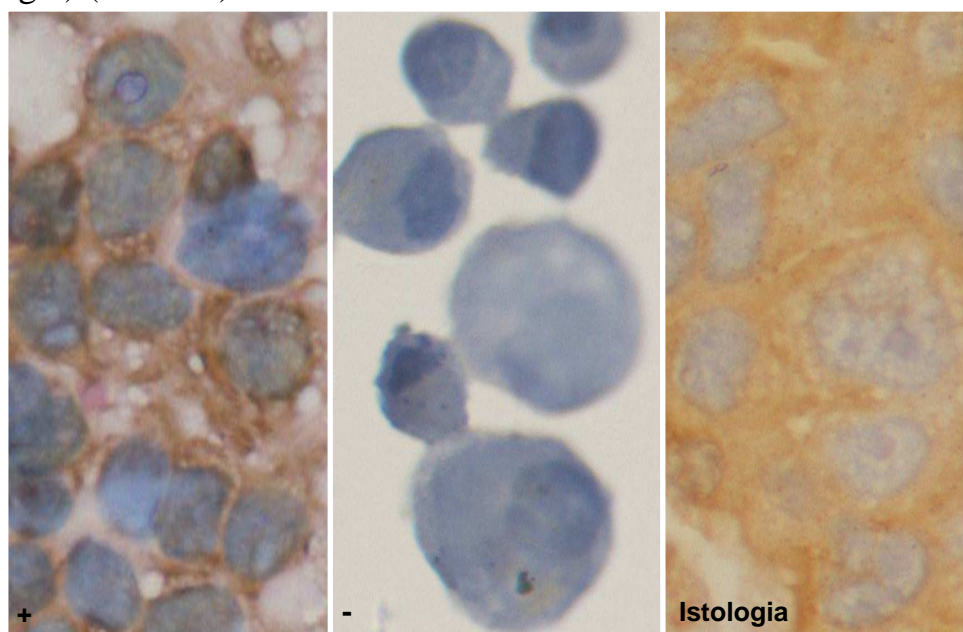


Figura 9: Reattività dell'anticorpo anti-citocheratina 19 (CK19). Reazione positiva delle cellule epiteliali di un adenocarcinoma presenti in un versamento pleurico di cane (+), reazione negativa delle cellule appartenenti ad un sarcoma istiocitario di cane (-) e confronto con l'istologia, allestita tramite citoincluso, dello stesso adenocarcinoma di cane rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

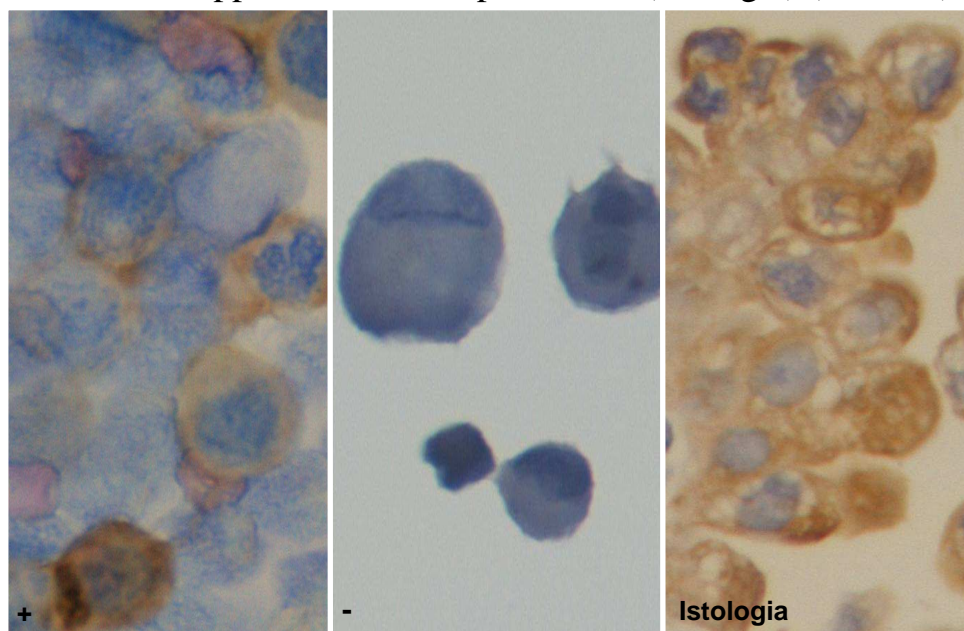


Figura 10: Reattività dell'anticorpo anti-enolasi neuronale specifica (NSE). Reazione positiva (+) in un carcinoma neuroendocrino di gatto (NSE+, CroA-, SYN-) e reazione negativa (-) in un carcinoma neuroendocrino di cane (NSE-, CroA+, SYN+) (Ob. 40x).

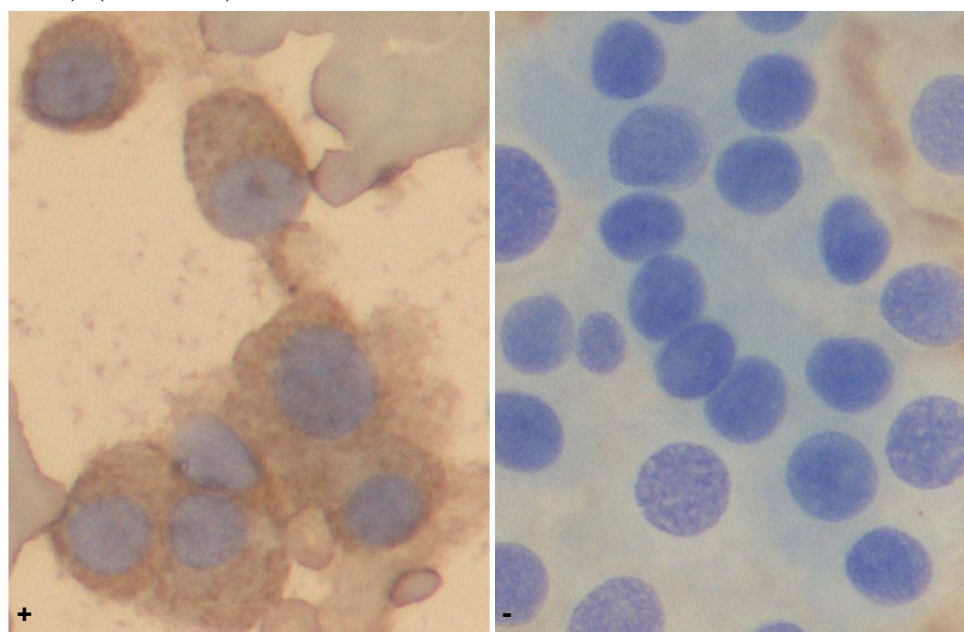


Figura 11: Reattività dell'anticorpo anti-citocheratina 5/6 (CK5/6). Reazione positiva delle cellule appartenenti ad un carcinoma delle cellule di transizione (+) e reazione negativa delle cellule appartenenti ad un adenocarcinoma prostatico (-) (Ob. 40x).

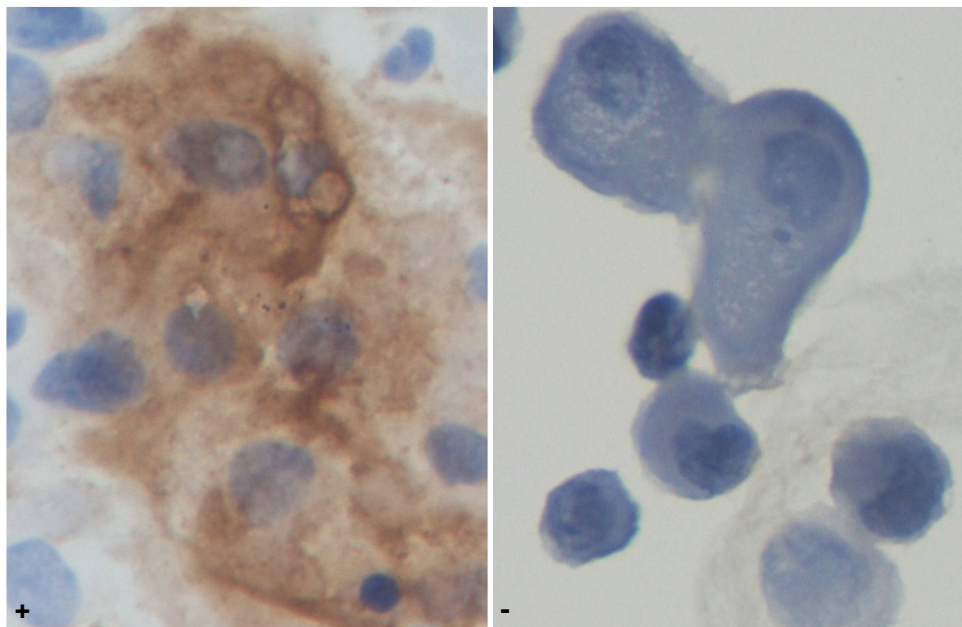


Figura 12: Reattività dell'anticorpo anti-CD3. Reazione positiva dei linfociti T di un linfoma di cane (+), reazione negativa dei linfociti B di un linfoma di cane (-) e confronto con l'istologia dello stesso linfoma di cane rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

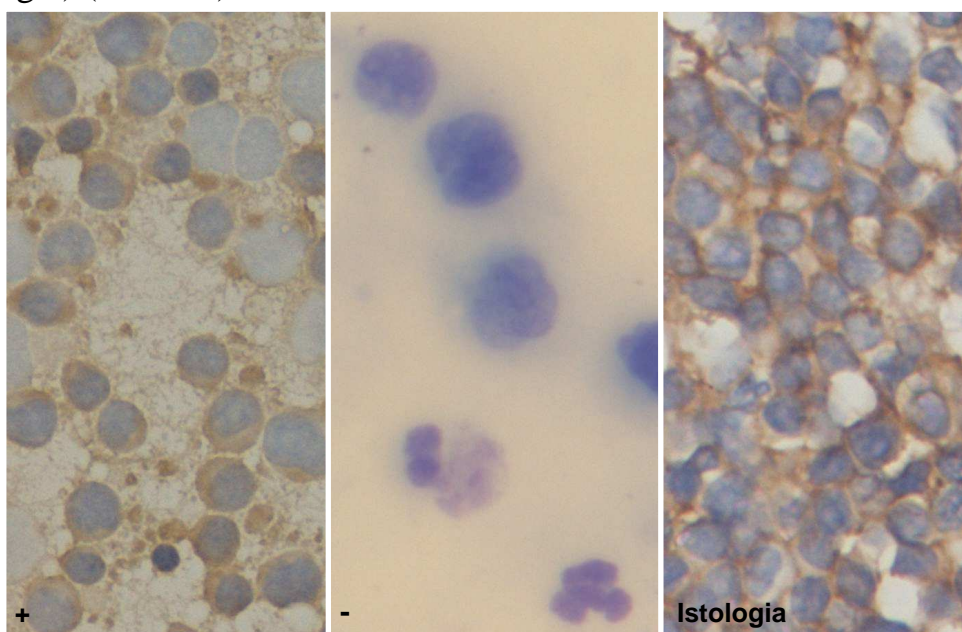


Figura 13: Reattività dell'anticorpo anti-mesotelina (MES). Reazione positiva delle cellule mesoteliali presenti in un versamento pleurico di cane (+) e reazione negativa delle cellule di un sarcoma istiocitario presenti in un versamento pericardico di cane (-) (Ob. 40x).

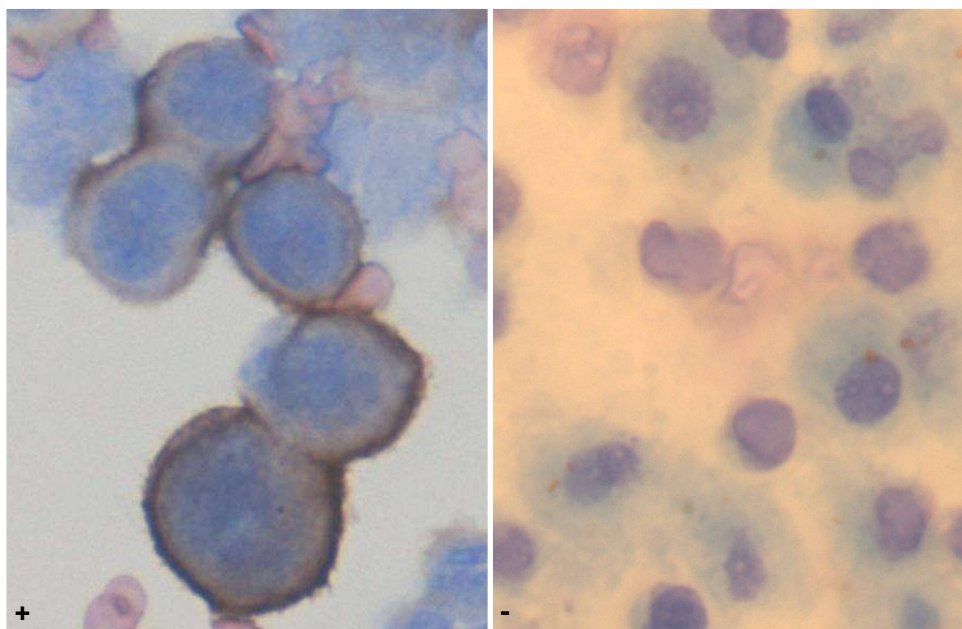


Figura 14: Reattività dell'anticorpo anti-CD79 α . Reazione positiva dei linfociti B di un linfoma di cane (+), reazione negativa dei linfociti T di un linfoma di gatto e confronto con l'istologia dello stesso linfoma di cane rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

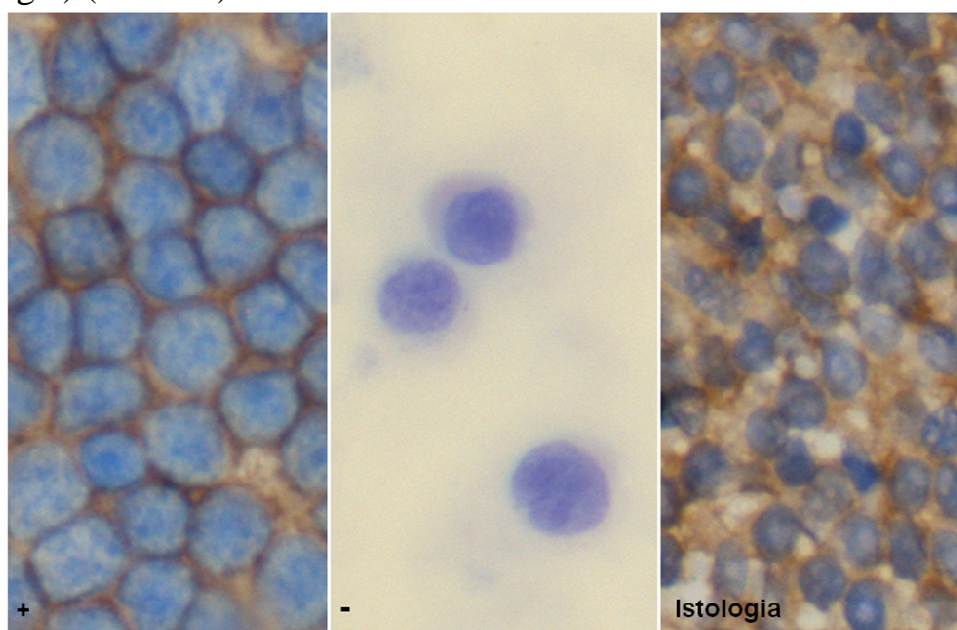


Figura 15: Reattività dell'anticorpo anti-citocheratina 14 (CK14). Reazione positiva delle cellule epiteliali appartenenti ad un adenocarcinoma prostatico di cane (+), reazione negativa delle cellule appartenenti ad un sarcoma istiocitario di cane (-) e confronto con l'istologia dello stesso carcinoma prostatico di cane rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

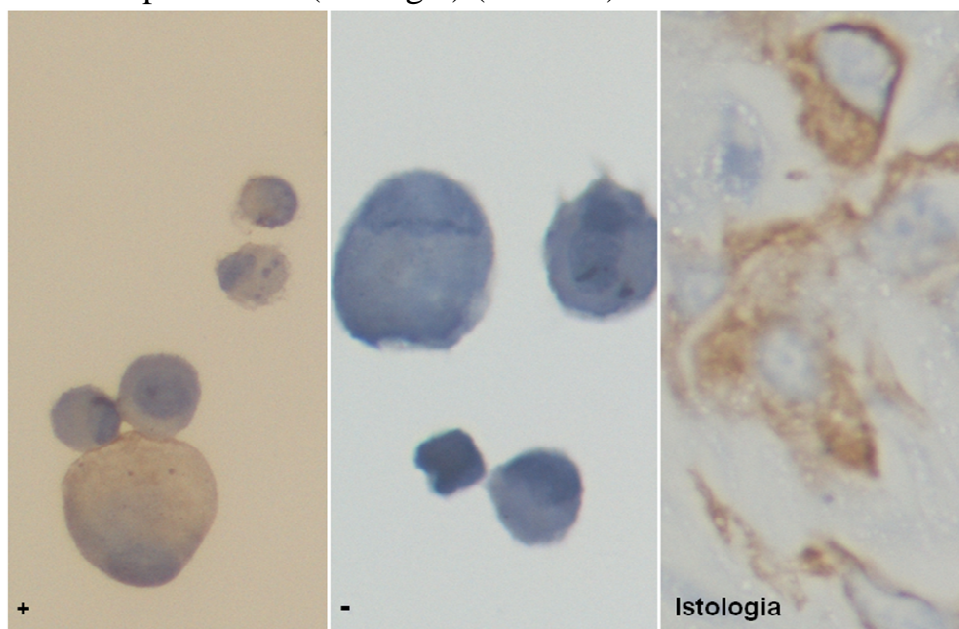


Figura 16: Reattività dell'anticorpo anti-antigene comune mielo-istiocitario (MAC). Reazione positiva dei macrofagi presenti in un versamento pleurico di cane (+) e reazione negativa delle cellule appartenenti ad una neoplasia a cellule rotonde indifferenziata di cane (-) (Ob. 40x).

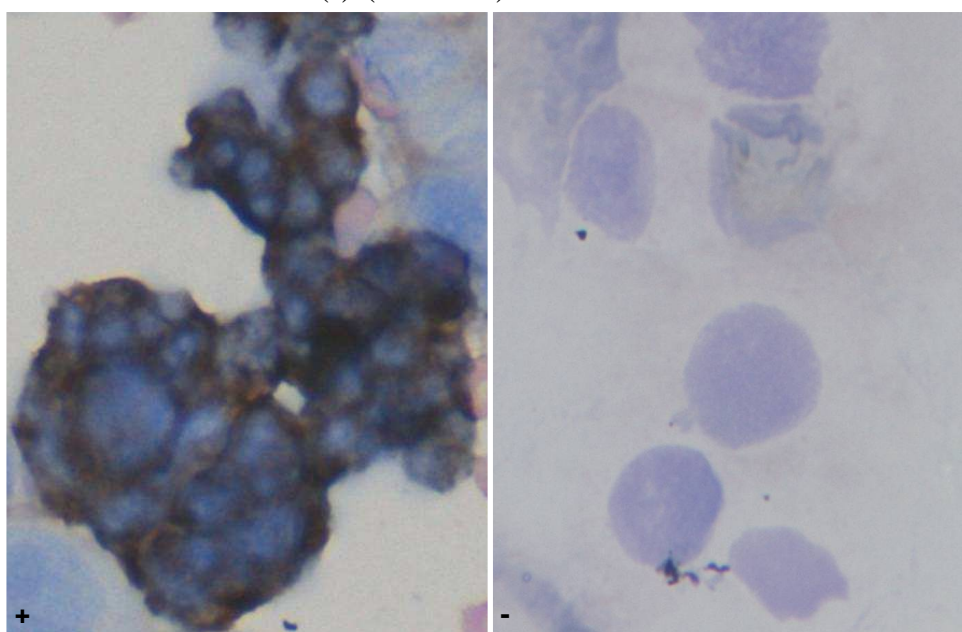


Figura 17: Reattività dell'anticorpo anti-sinaptofisina (SYN). Reazione positiva (+) in un carcinoma neuroendocrino di cane (NSE-, CroA+, SYN+) e reazione negativa (-) in un carcinoma neuroendocrino di gatto (NSE+, CroA-, SYN-) (Ob. 40x).

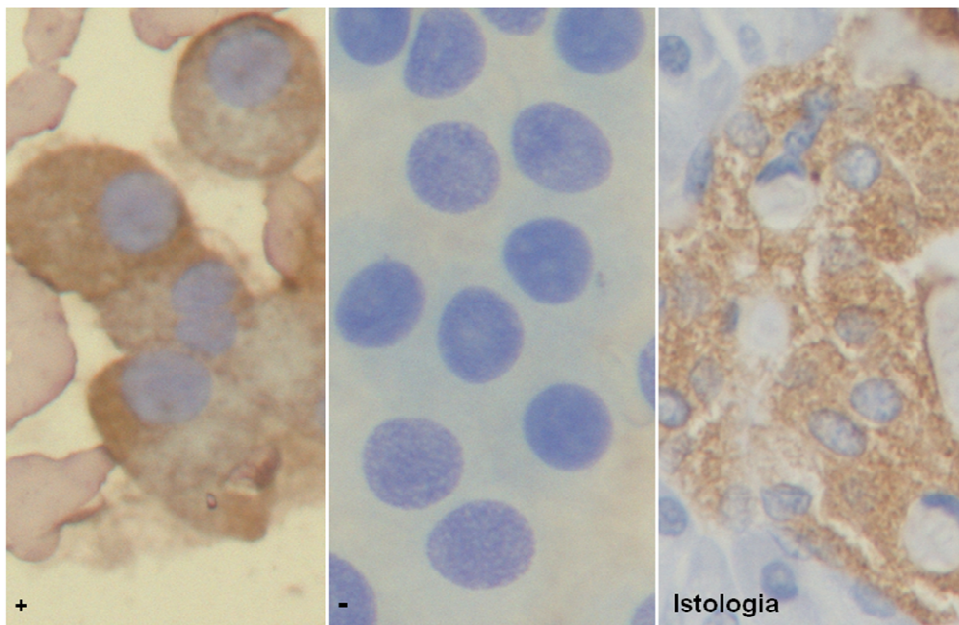


Figura 18: Reattività dell'anticorpo anti-vimentina (VIM). Reazione positiva delle cellule mesenchimali appartenenti ad un sarcoma di gatto (+), reazione negativa delle cellule appartenenti ad un adenocarcinoma prostatico di cane (-) e confronto con l'istologia dello stesso sarcoma di gatto rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

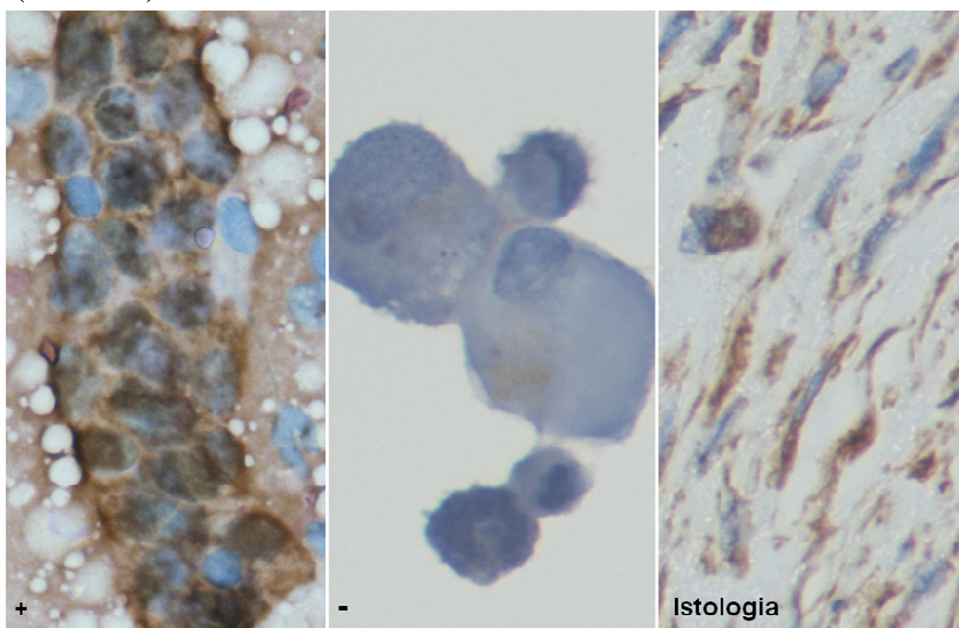


Figura 19: Reattività dell'anticorpo anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Reazione positiva delle cellule epiteliali di un carcinoma squamocellulare di gatto (+), reazione negativa delle cellule epiteliali di un carcinoma delle tonsille di cane e confronto con l'istologia dello stesso carcinoma squamocellulare di gatto rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

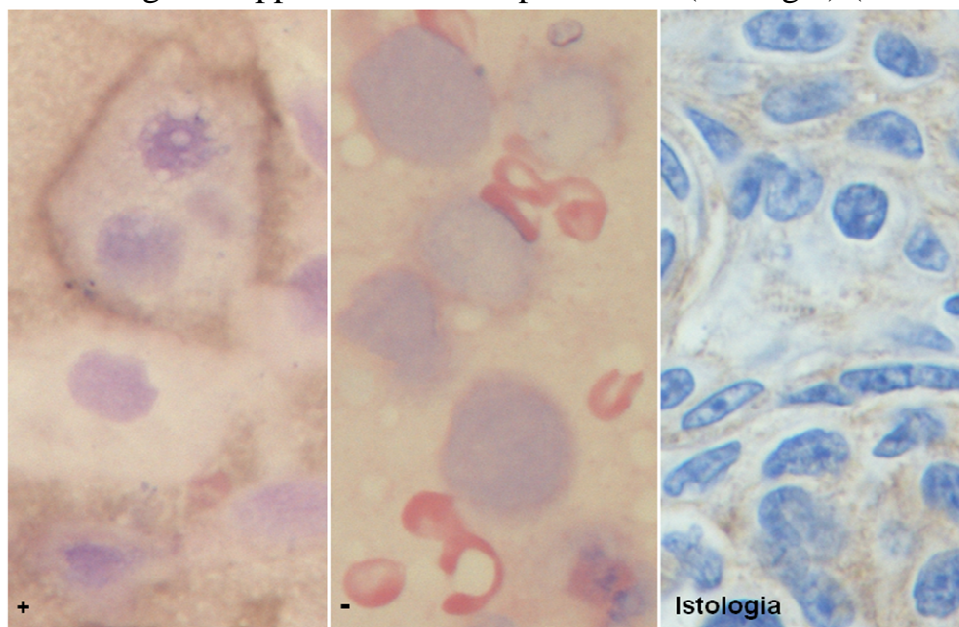


Figura 20: Reattività degli anticorpi anti-CD18 canino e felino. Reazioni positive delle cellule appartenenti ad un sarcoma istiocitario di cane (CD18 canino +) e dei macrofagi presenti in un versamento pleurico di gatto (CD18 felino +) e reazioni negative delle cellule appartenenti ad una neoplasia a cellule rotonde di sospetta natura istiocitaria di un cane (CD18 canino -) e di un gatto (CD18 felino -) (Ob. 40x).

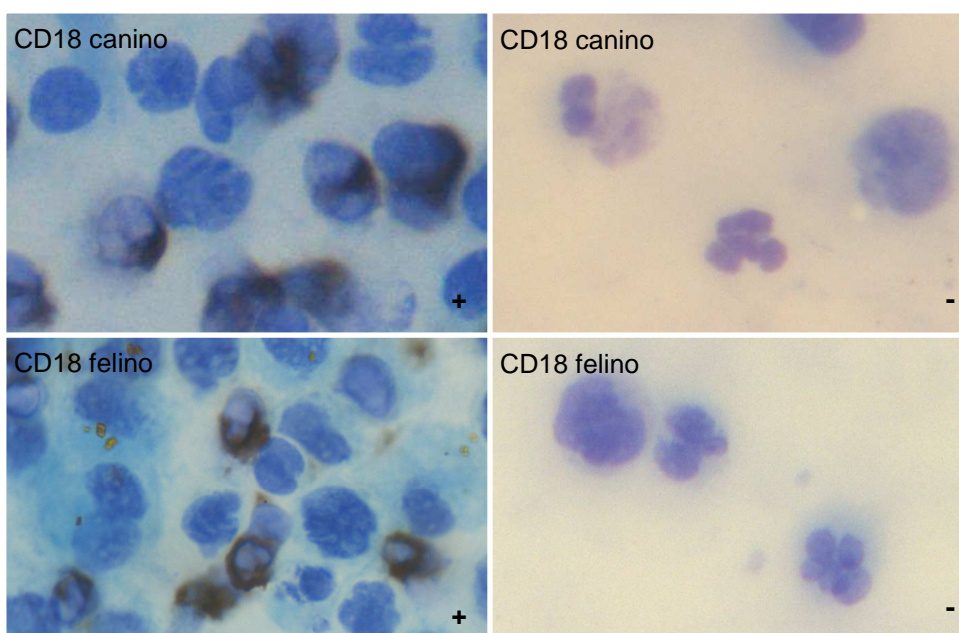


Figura 21: Reattività dell'anticorpo anti- CD45RA. Reazione positiva dei linfociti B di un linfoma di gatto (+), reazione negativa dei linfociti T di un linfoma di gatto (-) e confronto con l'istologia dello stesso linfoma di gatto rappresentato nella prima foto (Istologia) (Ob. 40x).

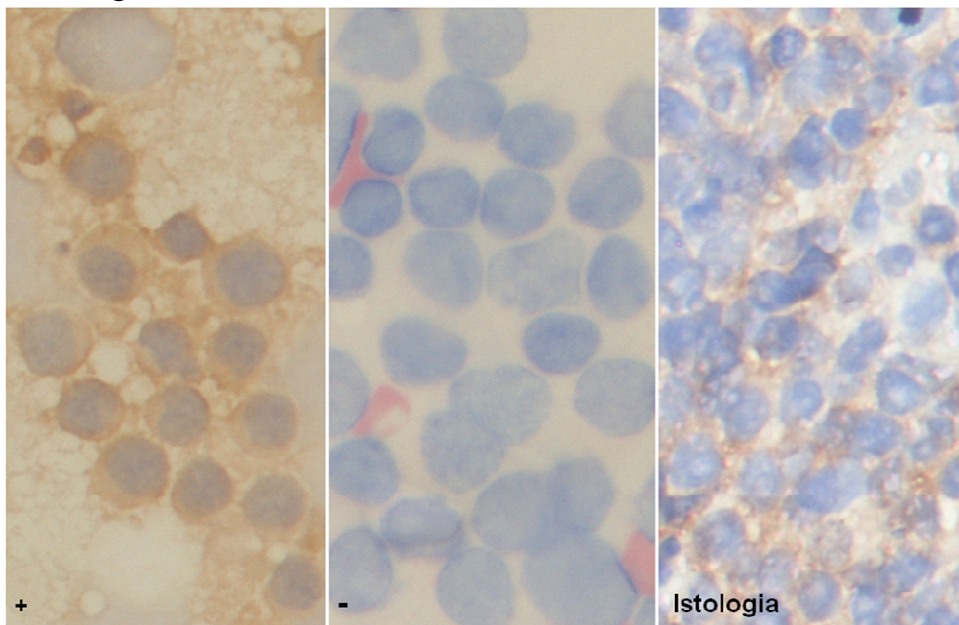


Figura 22: Reattività dell'anticorpo anti-CD117. Reazione positiva (KIT pattern 1) delle cellule di un mastocitoma cutaneo canino (+), reazione negativa delle cellule di un mastocitoma cutaneo canino anaplastico e confronto con l'istologia dello stesso mastocitoma cutaneo canino rappresentato nella prima foto (Istologia) (KIT pattern 1) (Ob. 40x).

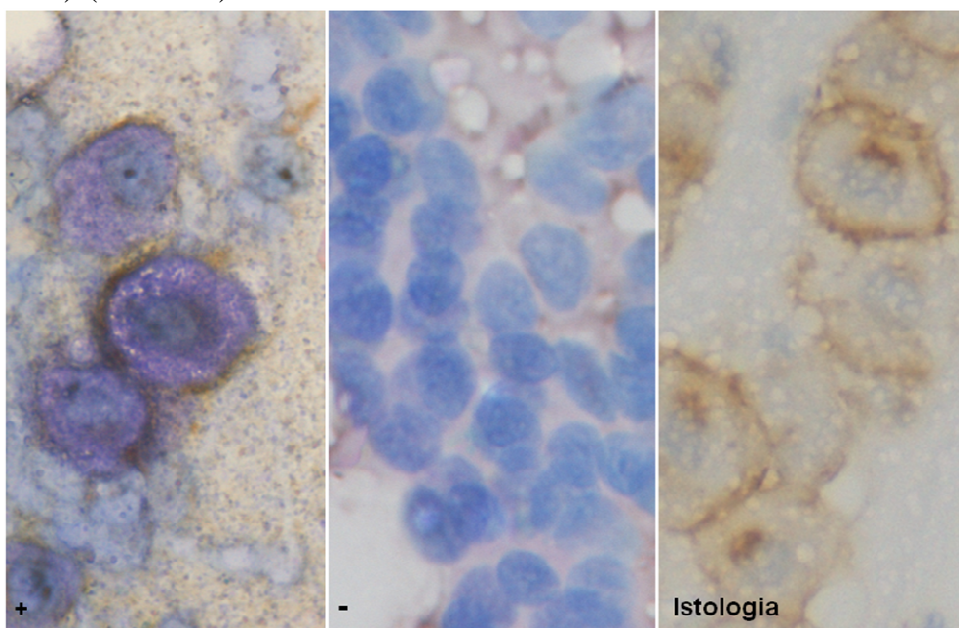


Figura 23: Reattività dell'anticorpo anti-cromogranina A (CroA). Reazione positiva (+) in un carcinoma neuroendocrino di cane (NSE-, CroA+, SYN+) e reazione negativa (-) in un carcinoma neuroendocrino di gatto (NSE+, CroA-, SYN-) (Ob. 40x).

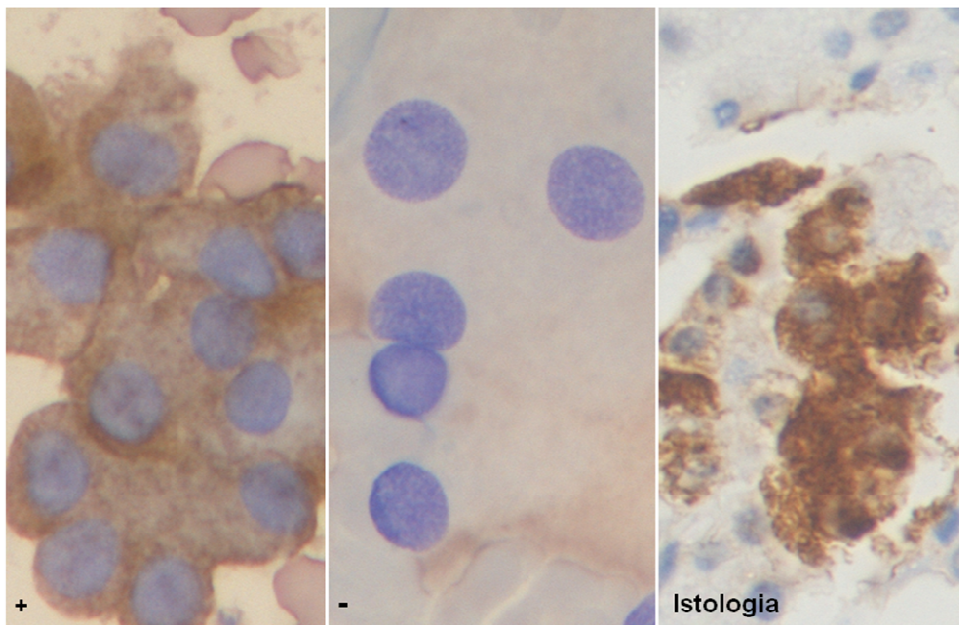


Figura 24: Reattività dell'anticorpo anti-fattore VIII della coagulazione (FVIII). Reazione positiva delle cellule appartenenti ad un emangiosarcoma di cane (+) e reazione negativa delle cellule appartenenti ad un sarcoma di cane (-) (Ob. 40x).

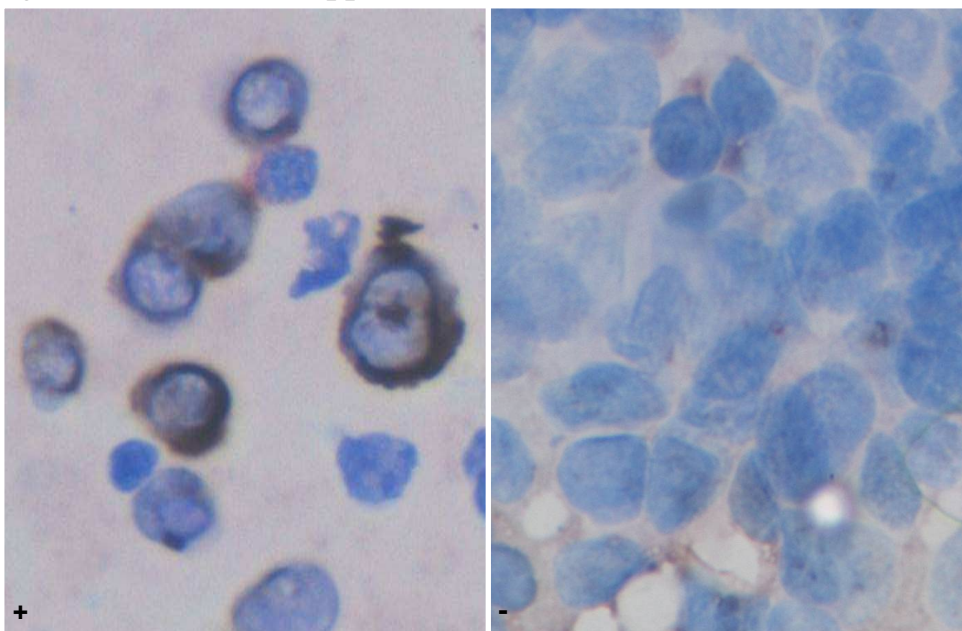
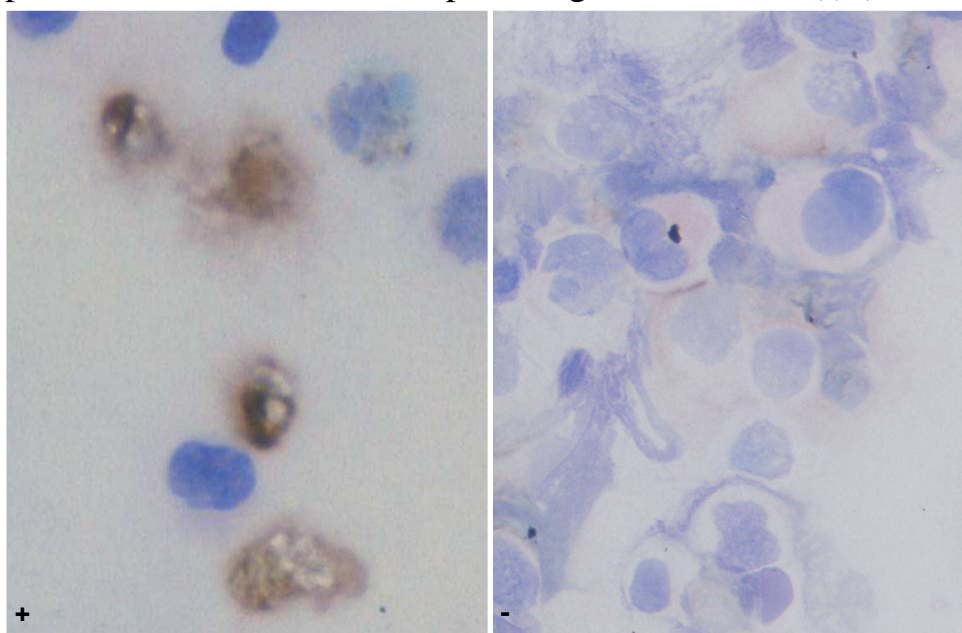


Figura 25: Reattività dell'anticorpo anti-lisozima (LIS). Reazione positiva delle cellule appartenenti ad un sarcoma istiocitario (+) e reazione negativa delle cellule di una neoplasia a cellule rotonde di sospetta origine istiocitaria (-) (Ob. 40x).



Il numero di anticorpi testati per caso è oscillato da 1 (soprattutto per i campioni sui quali venivano testati i markers prognostici) a 8 (applicati su un campione di sarcoma istiocitario al fine di ottenerne la tipizzazione), con una media di 1,94 anticorpi applicati per campione.

Tabella 9: Numero di anticorpi applicati per caso

Anticorpi (n°)	Casi (n°)
1	57
2	14
3	13
4	4
5	5
6	1
7	1
8	1
TOTALE	96

Tipizzazione delle neoplasie. Nei 30 casi in cui all'immunocitochimica era stata richiesta la tipizzazione di una neoplasia, i risultati ottenuti sono stati comparati

alla diagnosi finale raggiunta attraverso i dati raccolti tramite i rilievi clinici, citologici ed istologici (e talvolta autoptici) . I risultati sono risultati diagnostici in 8 casi (26,67%), confermativi in 11 (36,67%) ed equivoci nei rimanenti 11 (36,67%). L'efficacia diagnostica è risultata indipendente dal tipo di allestimento.

Tabella 10: Influenza del tipo di allestimento sui risultati della diagnostica immunocitochimica nella tipizzazione dei tumori

	Totale (n°)	Diagnostici (n°)	Confermativi (n°)	Equivoci	
				(n°)	%
Ago aspirato	20	6	8	7	35%
Impronta	9	2	3	3	33%
Coltura cellulare	1	0	0	1	100%
TOTALE	30	8	11	11	37%

Degli 8 risultati diagnostici, 6 erano stati preparati tramite agoaspirazione e 2 tramite impronta cellulare. Tre erano linfomi, 2 carcinomi, 1 sarcoma, 1 sarcoma istiocitario ed 1 leucemia mieloide.

Le tipologie tumorali indagate sono state 9 linfomi, 6 sarcomi, 4 carcinomi, 3 carcinomi neuroendocrini, 1 leucemia mieloide ed 1 sarcoma istiocitario. In 6 neoplasie, sulle quali la tipizzazione non è andata a buon fine, non è stato possibile raggiungere la diagnosi.

Tabella 11: Efficacia diagnostica dell'immunocitochimica nella tipizzazione delle neoplasie in 30 casi

Tumore	Totale (n°)	Diagnostici (n°)	Confermativi (n°)	Equivoci (n°)
Carcinoma	4	2	2	0
Carcinoma neuroendocrino	3	0	2	1
Linfoma	9	3	2	4
Leucemia mieloide	1	1	0	0
Sarcoma	6	1	5	0
Sarcoma istiocitario	1	1	0	0
Altro	6	0	0	6
TOTALE	30	8	11	11

Differenziazione tra lesione reattiva e neoplastica. I 5 campioni per i quali era stata richiesta la differenziazione tra lesione reattiva e neoplastica erano stati tutti allestiti da versamenti pleurici. In essi si è cercato di valutare la presenza di cellule tumorali tramite l'impiego di vari anticorpi. I risultati sono stati equivoci in un singolo caso, tuttavia in tutti gli altri l'approfondimento immunocitochimico è risultato utile alla diagnosi.

Le lesioni neoplastiche riscontrate (2 adenocarcinomi ed un mesotelioma) erano tutte positive all'anticorpo AE1/AE3 anti-pancitocheratina, tuttavia mentre il caso di mesotelioma era positivo anche all'HBME-1 ed al V9 (rispettivamente anti-mesotelina e anti-vimentina), i due versamenti carcinomatosi rispondevano colorandosi con l'anticorpo BA17 anti-CK19, in quanto di origine mammaria. Nessuna delle tre lesioni presentava cellule atipiche positive al MAC387.

La lesione reattiva invece presentava sia cellule anomale positive agli anticorpi anti-pancitocheratina, anti-mesotelina e anti-vimentina, sia cellule anomale positive al MAC387. Questo quadro indicava come le atipie riscontrate fossero a carico sia delle cellule mesoteliali, sia dei macrofagi, sia delle altre cellule infiammatorie e come fossero dovute all'attivazione di queste in risposta ad una flogosi del cavo pleurico.

Il campione il cui risultato è stato valutato equivoco presentava invece delle positività dubbie che non ha permesso di giungere alla diagnosi.

Tabella 12: Efficacia della differenziazione immunocitochimica tra lesioni reattive e neoplastiche nei preparati da versamento

	Lesione Reattiva	Lesione Neoplastica
Risultato diagnostico	1	3
Risultato equivoco	1	0

Valutazione dell'espressione di markers prognostici. Dei 51 campioni la cui indicazione principale era la valutazione dell'espressione di markers prognostici, 49 erano mastocitomi e 2 carcinomi, di cui uno di cane ed uno di gatto. Sui mastocitomi è stata saggiata e valutata l'espressione del recettore KIT, mentre sui carcinomi è stata valutata l'espressione dell'EGFR.

Dei 49 mastocitomi, 4 hanno dato risultati equivoci (8,16%). Per quanto riguarda i carcinomi, quello di cane è risultato non reattivo.

La numerosità dei campioni di mastocitoma a nostra disposizione ci ha permesso di approfondire ulteriormente l'argomento della valutazione del recettore KIT. I risultati di tale approfondimento sono stati riportati nel capitolo della tesi dedicato al mastocitoma.

Altre indicazioni. E' stato eseguito un test immunocitochimico su un campione di mastocitosi cutanea, che è risultato non reattivo a causa di un errore procedurale (errata diluizione dell'anticorpo).

Contributo dell'immunocitochimica alla diagnosi citologica di tumore. Dal punto di vista della casistica generale, l'immunocitochimica applicata a 83 preparati di origine tumorale ha permesso di raggiungere la diagnosi in 10 casi (12,04%), ha fornito dati concordanti con una precedente diagnosi citologica o istologica in 58 casi (69,88%) mentre ha fornito risultati discordanti o fuorvianti da una precedente diagnosi in 15 casi (18,08%).

In particolare è risultata diagnostica in 3 casi di carcinoma, 3 casi di linfoma, 1 di leucemia mieloide, 1 di mesotelioma, 1 di sarcoma ed 1 di sarcoma istiocitario. La tecnica si è invece limitata a confermare la diagnosi già raggiunta mediante il supporto della citologia, dell'istologia o dell'immunoistochimica (quando disponibili) in 4 carcinomi, 2 carcinomi neuroendocrini, 2 linfomi, 45 mastocitomi e 5 sarcomi. In 15 casi (1 carcinoma neuroendocrino, 4 linfomi e 4 mastocitomi) la tecnica ha fornito dei risultati equivoci, in quanto non ha fornito positività per nessun anticorpo o ha fornito positività discordanti dalle diagnosi già raggiunte mediante le altre tecniche.

Tabella 13: Contributo dell'immunocitochimica alla diagnosi citologica di tumore

Tumore	Totale (n°)	Diagnostici (n°)	Confermativi (n°)	Equivoci (n°)
Carcinoma	7	3	4	0
Carcinoma neuroendocrino	3	0	2	1
Linfoma	9	3	2	4
Leucemia mieloide	1	1	0	0
Mastocitoma	49	0	45	4
Mesotelioma	1	1	0	0
Sarcoma	6	1	5	0
Sarcoma istiocitario	1	1	0	0
Altro	6	0	0	6
TOTALE	83	10	58	15

Sono state indagate le cause di tutti i 17 risultati ritenuti equivoci all'interno della nostra casistica (19,54%) e sono state individuate le seguenti:

- l'assenza di positività di tutti gli anticorpi testati in 7 casi (41,17%), tutti appartenenti agli 11 totali della tipizzazione (63,64%). In questi 7 casi non è stato possibile capire se l'assenza di positività fosse legata ad errori di esecuzione della tecnica o alla scelta di anticorpi non pertinenti. Le neoplasie indagate infatti si presentavano citologicamente indifferenziate ed il pannello anticorpale era stato scelto sulla base dei sospetti diagnostici derivanti dai riscontri clinici,
- l'assenza di positività dell'unico anticorpo testato in 3 casi (14,29%), tutti appartenenti ai 4 incorsi nella casistica della valutazione del KIT (75%),
- l'applicazione di anticorpi non pertinenti al tipo di preparato in 2 casi (11,76%), tutti appartenenti al gruppo della tipizzazione (18,18%),
- la quantità insufficiente di cellule diagnostiche sui vetri testati in un caso (5,88%),
- la presenza di errori procedurali incorsi durante lo svolgimento dell'indagine in un caso (5,88%),
- la contaminazione con formalina post fissazione in acetone di un preparato (5,88%) appartenente alla casistica dei mastocitomi (25%),
- la positività degli anticorpi scelti forniva informazioni discordanti che impedivano la diagnosi su base immunologica in un caso (5,88%) appartenente al gruppo della tipizzazione (9,09%). In particolare, questo caso di neoplasia

indifferenziata presentava una positività della stessa popolazione cellulare sia alla vimentina che alla pancitocheratina,

- la positività dubbia degli anticorpi testati impediva la diagnosi in un caso (5,88%) appartenente al gruppo della tipizzazione (9,09%).

Tabella 14: Cause dei risultati equivoci

	Tutte le indicazioni (n°=87)	Tipizzazione neoplasie (n°=30)	Valutazione KIT (n°=51)
Anticorpi testati sbagliati	2	2	0
Contaminazione da formalina	1	0	1
Errore procedurale	1	0	0
Positività degli anticorpi testati non hanno portato alla diagnosi	1	1	0
Positività dubbia degli anticorpi	1	1	0
Quantità insufficiente di cellule diagnostiche	1	0	0
Tutti gli anticorpi testati risultano negativi	7	7	0
Unico anticorpo testato negativo	3	0	3
TOTALE	17	11	4

3.3 Discussione

Lo scopo di questa fase della nostra ricerca è stato quello di applicare la tecnica immunocitochimica da noi standardizzata ai casi citologici che pervenivano alla sezione, al fine di valutare i vantaggi diagnostici apportabili alla diagnostica citopatologica.

Gli studi sistematici su pannelli anticorpali ben definiti sono stati poco frequenti, la maggior parte del lavoro è stato svolto scegliendo, caso per caso, quali anticorpi dovessero comporre il pannello basandosi sulle indicazioni cliniche e citologiche.

L'immunocitochimica è stata richiesta spesso per altri scopi al di fuori di quello diagnostico, ma si è stimato che questa tecnica sia risultata utile a questo fine nel 80,46% dei casi, una percentuale molto vicina a quella riportata da Mitteldorf et al (1999), inoltre l'esperienza accumulata nel corso dei tre anni di ricerca potrebbe sicuramente far sì che il potere diagnostico di questa tecnica aumenti nel corso del tempo, consentendo per esempio di individuare quali siano i pannelli anticorpali più efficaci da applicare nel momento in cui ci si trovi a dover lavorare su determinate diagnosi differenziali oppure creando delle specifiche sempre più chiare ed efficaci per i citologi che eseguono il campionamento.

Le cause dei risultati errati o dubbi sono risultate per lo più collegate a errori di fissazione o alla scarsità del materiale cellulare disponibile, soprattutto nei casi che ci sono stati conferiti dall'esterno.

Dal momento che la fissazione può alterare gli epitopi, i suoi effetti sulla immunoreattività dei preparati possono compromettere in maniera importante i risultati della prova immunocitochimica.

Quando non vengono rispettati i tempi e le temperature di fissazione le positività ottenute o mancanti risultano estremamente difficili da collocare in un contesto diagnostico e spesso finiscono per creare più dubbi che fornire risposte. Si evince quindi che questa semplice, ma tuttavia cruciale, fase della prova deve essere effettuata con la necessaria attenzione del caso, e questa premura deve essere trasmessa anche agli operatori esterni che effettuano il campionamento in altre sedi e si trovano a dover fissare i campioni prima del trasporto.

Molte "reazioni anomale" sono legate al fatto che le cellule tumorali non sempre seguono le regole della normale crescita e differenziazione (Chess et al., 1986; Lozowski et al., 1987). In altri casi le perplessità sorgono al momento della lettura: la decisione di quando definire una cellula positiva piuttosto che negativa risulta

spesso difficile a causa di una moltitudine di fattori che non sono facilmente definibili in ogni singolo caso.

Come se questo non bastasse, possono subentrare anche fattori tecnici a complicare il quadro interpretativo: può accadere ad esempio che, durante la colorazione immunocitochimica o l'applicazione del contrasto le cellule diagnostiche vengano dilavate (Chess et al., 1986, Dalquen et al., 1993), oppure che le cellule si presentino ammassate in grossi cluster, fatto che ostacola o impedisce la penetrazione dell'anticorpo (Chess et al., 1986; Dinges et al., 1989; Dalquen et al., 1993) e quindi compromette la colorazione delle porzioni interne del cluster stesso. Un altro inconveniente tecnico che può insorgere è quello della presenza di una colorazione di fondo, osservata nello studio di Chess et al. (1986) nel 20% dei preparati. Nella nostra casistica il problema è stato molto più contenuto, probabilmente grazie all'uso del sistema di rivelazione di tipo Biotina-Streptoavidina che è molto specifico. Se da una parte la colorazione di fondo può essere dovuta a reazioni non specifiche o all'eccessiva concentrazione dell'anticorpo, dall'altra bisogna ricordare che potrebbe anche essere una reazione specifica verso un antigene fuoriuscito dalla cellule conseguente alla rottura della membrana citoplasmatica.

Alcuni autori (Dalquen et al., 1993) riportano problemi di falsa positività legata alla presenza di cellule in degenerazione. La nostra esperienza conferma questo tipo di episodio, tuttavia non abbiamo mai incontrato interferenze tanto gravi da compromettere la lettura dei preparati.

Sicuramente più frequente è stata la situazione in cui, l'intensità della reazione immunocitochimica era difficile da determinare a causa del cattivo stato di conservazione del citoplasma. Questo disguido può avvenire soprattutto a causa di errori nella fissazione o di contaminazioni da sostanze particolari post-fissazione. In particolare ci era pervenuto un caso fissato in acetone che si era contaminato, durante il trasporto, con formalina: in questa situazione specifica non è stato possibile ottenere alcuna reazione dall'applicazione della nostra tecnica.

La scomparsa dell'immunoreattività dopo 8-10 giorni di conservazione a temperatura ambiente o a 4°C è stata descritta da moltissimi autori per svariati antigeni (Banks et al., 1983; Dalquen et al., 1993; Dinges et al., 1989; To et al., 1981), tuttavia i pochi campioni che abbiamo dovuto conservare per un periodo superiore alla settimana hanno reagito benissimo anche dopo svariati mesi. Nello specifico, il nostro controllo positivo per l'antigene KIT è risultato perfettamente

reattivo anche nell'ultima prova in cui è stato impiegato, a più di 8 mesi dall'allestimento dell'impronta, mentre quello utilizzato come controllo positivo per la pancitocheratina, le citocheratine 5/6, 14 e 19, la vimentina e la mesotelina ha dato una positività chiaramente dimostrabile per circa 6 mesi. Nonostante Dinges et al. (1989) e Dalquen et al., (1993) raccomandino, per ottenere risultati simili, di mantenere i preparati in metanolo assoluto o in soluzioni ad hoc a -20°C, al nostro laboratorio è stato necessario applicare solo la routinaria fissazione in acetone a 4°C per 10 minuti e la conservazione in frigo a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

L'applicazione della nostra particolare colorazione di contrasto, il May Grünwald-Giemsa modificato, ha permesso di risolvere in maniera adeguata il problema della difficoltà di individuazione delle cellule diagnostiche all'interno di una popolazione cellulare mista. Essa fornisce infatti una grande quantità di dettagli nucleari e citoplasmatici, semplificando l'identificazione delle varie popolazioni cellulari, senza mascherare o coprire la positività ottenuta.

Una delle situazioni più difficile da interpretare è quella nella quale l'immunocitochimica e l'immunoistochimica forniscono risultati discordanti. Lozowski et al (1987) riportano di essersi imbattuti in questo problema nel 10% dei casi testati in uno studio condotto su pazienti umani. Anche nella nostra casistica è stato riscontrato questo fenomeno, soprattutto nella valutazione del recettore KIT, nella quale l'interpretazione della positività è anche di tipo qualitativo.

La mancanza di controlli è il secondo fattore, in ordine di importanza, che potrebbe inficiare l'attendibilità degli studi immunocitochimici sul materiale citologico. Fondamentalmente, le reazioni positive e negative dovrebbero essere controllate sia nel caso in cui si stia lavorando sulla citologia, sia nel caso in cui si stia lavorando sull'istologia. Le reazioni di falso positivo sono raramente possibili da verificare a causa del basso numero di strisci inviati, tuttavia gran parte di esse vengono annullate dal procedimento di inibizione delle perossidasi. Le reazioni negative dovute all'inattivazione dell'anticorpo possono essere controllate più facilmente valutando la positività delle cellule normali sullo striscio o, in altri casi, aggiungendo strisci la cui positività è già nota all'interno della prova. La seconda opzione è quella più difficile da attuare, ma anche la più efficace in quanto, anche se non sempre è possibile avere a disposizione un campione adeguato per il confronto, la possibile concomitanza di fattori quali cellule diagnostiche non

reattive e cellule di riferimento assenti sullo striscio ci lascia nel dubbio che la positività mancata delle cellule di nostro interesse possa essere vera (assenza degli epitopi specifici) oppure legata ad errori nell'esecuzione della prova (artefatti). Questo problema può essere in parte aggirato inserendo nella stessa prova un anticorpo la cui positività, in caso di negatività del primo, sia scontata.

Inoltre si può inserire all'interno della prova qualche anticorpo in grado di dare una positività forte (PanCK, VIM,...) in modo da avere almeno la conferma che non ci siano stati errori interni alla prova (Dalquen et al., 1993). In ogni caso è necessario ricordare che la diagnosi non dovrebbe mai venir perseguita tramite l'uso di un singolo anticorpo (Ghosh et al., 1983, Fowler et al., 2008).

Nella nostra esperienza l'indagine immunocitochimica è stata impiegata per tre scopi principali: la tipizzazione delle neoplasie, la distinzione tra lesione reattiva e lesione neoplastica e la valutazione dell'espressione di markers di interesse prognostico e terapeutico.

3.3.1 Tipizzazione delle neoplasie

Il compito principale dell'immunocitochimica è quello di fornire l'aiuto necessario alla citologia per la tipizzazione delle neoplasie. Questo problema si presenta abbastanza di frequente sia che ci si trovi a valutare un ago-aspirato, sia che ci si trovi a valutare un qualsiasi altro tipo di allestimento citologico. Vari lavori hanno attestato il beneficio diagnostico apportato dall'immunocitochimica in questo senso (Barsotti et al., 2007; Caniatti et al., 1996; Höinghaus et al., 2008, Mitteldorf et al., 1999; Takauji et al., 2007). In particolare, nel caso in cui ci si trovi di fronte a tumori rari, questa tecnica diventa un valido sistema di supporto alla diagnosi morfologica (Dalquen et al., 1993).

Nella nostra esperienza, l'indagine immunocitochimica è risultata utile alla tipizzazione delle neoplasie testate in circa un terzo dei casi pervenuti. In questi casi non solo ha migliorato l'accuratezza diagnostica dell'esame citologico, ma talvolta ha anche fornito informazioni aggiuntive fondamentali al raggiungimento della diagnosi stessa.

Di seguito vengono analizzati i pannelli anticorpali applicati per la tipizzazione delle varie neoplasie.

I *linfomi* hanno rappresentato la principale sfida diagnostica, rappresentando da soli il 30% della casistica della tipizzazione. Gli esami immunocitochimici eseguiti sui preparati con sospetto di linfoma hanno dato esiti altalenanti. Le performances deludenti della tecnica nell'ultimo anno di applicazione a questo tipo di indagine tuttavia, sono da implicarsi a dei problemi interni al laboratorio se non addirittura all'anticorpo stesso, in quanto anche i risultati immunoistochimici ottenuti in tal senso hanno subito un notevolissimo calo di qualità.

Spesso la diagnosi di linfoma può essere raggiunta semplicemente tramite la lettura del solo preparato citologico tuttavia, laddove i casi potevano risultare dubbi o border line, l'immunocitochimica ha permesso di raggiungere la sicurezza della diagnosi fornendo contemporaneamente anche l'immunofenotipizzazione della neoplasia stessa.

E' di fondamentale importanza utilizzare, laddove possibile, più anticorpi sul preparato, in modo da poter inquadrare in maniera ottimale la situazione.

Il nostro pannello anticorpale per la diagnosi e la tipizzazione del linfoma è costituito da un anticorpo anti-CD3 (F7.2.38), specifico per i linfociti T, uno anti-CD79 α (HM57) ed uno anti-CD45RA, entrambi specifici per i linfociti B.

L'importanza di avere più anticorpi nel proprio pannello viene evidenziata nel momento in cui le positività conducano a risultati contrastanti o a nessun risultato, ed aiutano ad collocare in un giusto contesto la negatività di determinati anticorpi che la nostra esperienza ha dimostrato meno specifici (ad esempio l'HM57 anti-CD79 α).

Sono stati indagati vari tipi di *sarcomi* tramite l'applicazione di anticorpi AE1/AE3 (anti-pancitocheratina) e V9 (anti-vimentina).

L'anticorpo anti-pancitocheratina è applicato in questo caso nella discriminazione diagnostica iniziale, coadiuvata dall'anticorpo anti-vimentina tra neoplasie di origine epiteliale o mesenchimale. L'anticorpo anti-vimentina conferma l'origine mesenchimale e funge da controllo positivo interno. Nei casi in cui era stata sospettata una possibile origine del sarcoma dalla parete dei vasi ematici il pannello anticorpale era stato integrato con anticorpi anti-fattore VIII^o ed anti-CD117, il primo per confermare il sospetto di emangiosarcoma, il secondo per valutare le osservazioni di alcuni autori (Sabattini et al., 2009) che riportano la presenza di mastociti ad accompagnare questo tipo di lesione.

Il terzo gruppo, in ordine di numerosità di casi, è stato quello dei *carcinomi*. Gli anticorpi testati in questo tipo di tumore sono stati quelli AE1/AE3 (anti-pancitocheratina), V9 (anti-vimentina), D5/16B4 (anti-citocheratina 5/6), LL002 (anti-citocheratina 14) e BA17 (anti-citocheratina 19).

Come sopra descritto per i sarcomi, gli anticorpi anti-pancitocheratina ed anti-vimentina lavorano in sinergia al fine di dare un inquadramento iniziale della neoplasia (se epiteliale, mesenchimale o a componenti miste) e forniscono dei controlli interni positivi (AE1/AE3) e negativi (V9). Gli anticorpi specifici per le altre citocheratine hanno permesso, in base alle positività riscontrate, di indagare più approfonditamente l'origine dei tumore testati: l'anticorpo D5/16B4 (anti-citocheratina 5/6) marca le cellule dello strato basale e parte di quello spinoso degli epiteli squamosi, il LL002 (anti-citocheratina 14) marca invece gli strati basali degli epiteli pluristratificati squamosi e non mentre il BA17 (anti-citocheratina 19) è in grado di evidenziare le cellule degli epiteli semplici o pseudo stratificati, ma non degli epiteli squamosi. Se quindi un tumore era positivo alla citocheratina 5/6 ed alla citocheratina 14 era proveniente dallo strato basale di un epitelio squamoso, se era positivo solo alla citocheratina 14 proveniva dallo strato basale di un epitelio pluristratificato non cheratinizzato mentre se era positivo alla citocheratina 19 proveniva da un epitelio semplice non cheratinizzato.

Il nostro studio ha indagato poi sui *tumori di origine neuroendocrina*, applicando come markers anticorpi anti-NSE, sinaptofisina e cromogranina A. Nonostante il fatto che sia stato possibile confermare la diagnosi di tumore neuroendocrino in tutti i casi testati (la diagnosi era stata raggiunta in tutti e 3 i casi tramite la citologia), non si è mai riusciti, applicando questi soli tre anticorpi, a raggiungere una diagnosi di sede di insorgenza.

Nella nostra esperienza sono capitati anche un caso di *sarcoma istiocitario* ed un caso di *leucemia mieloide*. Ovviamente, vista la presenza di casi singoli, non è stato possibile testare ulteriormente i pannelli anticorpali utilizzati, tuttavia gli anticorpi utilizzati in quelle singole occasioni sono riportati e commentati di seguito.

Nel caso del *sarcoma istiocitario* è stata utilizzata una combinazione di F7.2.38 (anti-CD3), HM57 (anti-CD79α), MAC387 (anti-antigene comune mielo-

istiocitario), HBME-1 (anti-mesotelina), AE1/AE3 (anti-pancitocheratina), V9 (anti-vimentina), un anticorpo anti-CD117 ed uno anti-lisozima. Il caso era stato inviato come versamento pleurico di natura neoplastica causato da una neoplasia a cellule rotonde. Gli anticorpi HBME-1, AE1/AE3, V9 sono stati utilizzati al fine di confutare l'eventuale presenza di un mesotelioma o di un adenocarcinoma come causa del versamento (come descritto nel paragrafo seguente).

Per effettuare la distinzione tra le varie tipologie di cellule rotonde sono stati impiegati il F7.2.38 (anti-CD3) ed il HM57 (anti-CD79 α) per evidenziare i linfociti, il MAC 387 e l'anticorpo anti-lisozima per mostrare granulociti neutrofili, eosinofili, e macrofagi ed l'anticorpo anti-CD117 per rivelare i mastociti.

La *leucemia mieloide* invece è stata indagata con un pannello costituito da F7.2.38 (anti-CD3), HM57 (anti-CD79 α), MAC387 (anti-antigene comune mielo-istiocitario) e l'anticorpo anti-lisozima.

L'anamnesi forniva già un quadro di leucemia in corso per cui, tramite l'indagine per gli antigeni linfocitari (CD3 e CD79 α) ed istiocitari (MAC e lisozima) si è riusciti a tipizzare la patologia.

Tra le tipizzazioni delle varie malattie neoplastiche sono stati esaminati anche dei *versamenti pleurici di sospetta origine neoplastica* (adenocarcinoma e mesotelioma) che vengono trattati nel paragrafo seguente.

3.3.2 Differenziazione tra lesione reattiva e neoplastica

L'esperienza acquisita dal nostro laboratorio per quanto riguarda differenziazione tra lesione neoplastica e reattiva è stata piuttosto ridotta a causa del limitato numero di campioni. Molti dei casi infatti venivano inviati già corredati di diagnosi di neoplasia.

Seppur scarni, i nostri risultati confermano quelli di altri autori (Dalquen et al., 1993) sul fatto che è possibile utilizzare questo tipo di indagine su qualsiasi tipo di campione citologico, anche se la maggior parte della nostra casistica era composta da ago aspirati.

Quando l'immunocitochimica nacque venne applicato sistematicamente un discreto numero di anticorpi, come ad esempio CEA, AFP e B72.3 (Szpak et al., 1984; Walts et al., 1983) nella convinzione che determinati markers fossero

tumore-specifici. Tuttavia, dopo poco tempo, gli stessi antigeni vennero dimostrati anche sulle cellule non neoplastiche e così il concetto del singolo marker diagnostico per una neoplasia è stato abbandonato. Nonostante ciò, l'immunocitochimica applicata con criterio è in grado di aiutare ad individuare, confermare o indagare un sospetto di neoplasia, ed esprime la sua massima utilità proprio in quei casi in cui la citologia normale raggiunge i suoi limiti prima di portare ad una diagnosi certa. I casi più interessanti sono l'esame dei fluidi corporei o dei versamenti e la valutazione dei sospetti di linfoma (Dalquen et al., 1993).

Per quanto riguarda i versamenti, i casi in cui si riscontrano problemi nel raggiungimento della diagnosi si attestano, in medicina umana, sul 15% del totale (To et al., 1981). Spesso risulta estremamente difficile distinguere macrofagi attivati, cellule mesoteliali reattive e cellule neoplastiche. Sono stati effettuati svariati tentativi al fine di aggirare questo problema tramite l'immunocitochimica (Chandra et al., 1990; Chheda et al., 1986; Daste et al., 1991; Epenetos et al., 1982; Esteban et al., 1990; Ghosh et al., 1983; Gosh et al., 1986; Guzman et al., 1988, 1990b; Kyrkou et al., 1985; Li et al., 1989; Mason et al., 1986; Orell et al., 1983; Permanetter et al., 1987; Szpak et al., 1984, 1989; Tickman et al., 1990; To et al., 1981; Walts et al., 1983): in linea generale è stato suggerito da tutti l'uso di due o più anticorpi, uno che reagisse solo con le cellule epiteliali ed un altro che reagisse con le sole cellule mesoteliali o con i macrofagi e le cellule mesoteliali contemporaneamente.

Alcuni autori hanno combinato l'uso di anticorpi anti-CEA con anticorpi anti-cheratine (Duggan et al., 1987; Epenetos et al., 1982; Ghosh et al., 1983), anti-antigene di membrana degli epitelii (EMA) (Chheda et al., 1986; Daste et al., 1991; Epenetos et al., 1982; Ghosh et al., 1983; Guzman et al., 1990b; To et al., 1981), anti-vimentina insieme a molti altri anticorpi (Duggan et al., 1987; Tickman et al., 1990; Walts et al., 1983).

Altri hanno tentato di risolvere il dilemma ricorrendo ad anticorpi specifici per alcuni antigeni onco-fetali (Orell et al., 1983), per il lisozima (Permanetter et al., 1987) o a combinazioni anti-EMA, CD45, citocheratine e vimentina (Li et al., 1989) o ricorrendo a svariati altri stratagemmi (Chandra et al., 1990; Guzman et al., 1990a; Martin et al., 1986).

Sfortunatamente molti degli anticorpi con la maggiore reattività nei confronti degli epitopi epiteliali (es: anti-pancitocheratine e anti-cheratine) reagiscono anche con

le cellule mesoteliali. Altri, più specificamente diretti contro gli antigeni di membrana epiteliali (EMA, HEA125, BerEP4) reagiscono marcatamente con le cellule carcinomatose e solo debolmente con qualche cellula non neoplastica. Esistono altri anticorpi (anti-CEA, B72.3, Leu-M1) che hanno dimostrato un'ottima specificità per le cellule carcinomatose, tuttavia la sensibilità è stata valutata attorno al 55-75% (Orell et al., 1983; Tickman et al., 1990; To et al., 1981). Sulla base di quanto detto, l'efficacia di questi markers per il riconoscimento delle cellule tumorali è piuttosto limitata.

Attualmente noi utilizziamo un pannello anticorpale composto da AE1/AE3, BA17, D5/16B4,

HBME-1, MAC387, V9 ed un anticorpo anti-lisozima.

L'AE1/AE3 è un anticorpo anti-pancitocheratina che colora sia le cellule epiteliali sia quelle mesoteliali, ma non i macrofagi reattivi. Il BA17 è un anticorpo anti-citocheratina 19 in grado di evidenziare le cellule degli epiteli semplici o pseudostratificati, ma non le cellule degli epiteli squamosi, il che lo rende estremamente utile per dimostrare l'eventuale presenza di cellule carcinomatose di origine ghiandolare. Il D5/16B4 è un anticorpo anti citocheratina 5/6, che evidenzia le cellule epiteliali basali degli epiteli pluristratificati, utile per dimostrare l'eventuale presenza di cellule carcinomatose provenienti da tumori dell'epitelio cheratinizzato. L'HBME-1 evidenzia la mesotelina delle le cellule mesoteliali normali, reattive e neoplastiche. Il MAC387 dimostra un antigene comune mielo-istiocitario permettendo di distinguere i macrofagi e le altre cellule infiammatorie. Anche l'anticorpo anti-lisozima permette di identificare tali cellule. Il V9 anti-vimentina infine tinge contemporaneamente i macrofagi e le cellule mesoteliali. Tuttavia l'interpretazione dei risultati non è comunque facile a causa delle deboli positività che talvolta si possono sviluppare in cellule non specifiche per gli anticorpi. Solo le positività intense diffuse a tutto il citoplasma dovrebbero essere considerate attendibili (To et al., 1981).

3.3.3 Valutazione dell'espressione di markers di interesse prognostico e terapeutico

L'ultimo campo nel quale è stata concentrata la maggiore attenzione del nostro studio sull'immunocitochimica è quello della valutazione dell'espressione di markers di interesse prognostico e terapeutico.

La trattazione delle considerazioni in merito ai risultati ottenuti dall'applicazione dell'immunocitochimica del CD117 ai mastocitomi sono riportate nel capitolo dedicato al mastocitoma.

E' stato eseguito qualche test anche sulla valutazione dell'espressione dell'EGFR in carcinomi di cane e di gatto. L'EGFR è un altro recettore ad attività tirosinchinasi che è stato dimostrato avere un ruolo nella proliferazione neoplastica delle neoplasie epiteliali maligne (Arteaga, 2002; Lo et al., 2007; Mendelsohn et al., 2000).

Dei carcinomi esaminati, quello di cane è risultato non reattivo, probabilmente a causa della mancata espressione dell'antigene nelle cellule del preparato.

I risultati iniziali sono stati incoraggianti e la comparazione della positività tra immunocitochimica ed immunoistochimica ha fatto notare quanto il tipo di espressione della positività fosse simile. Purtroppo la scarsità della casistica non ha permesso di approfondire ulteriormente le implicazioni legate all'applicazione di metodiche immunocitochimiche per la ricerca di questo tipo di recettore.

3.3.4 Altre indicazioni

La diagnostica oncologica è indubbiamente l'indicazione fondamentale per cui nasce l'esame immunocitochimico. Tuttavia tale metodo oggi ricopre ruoli rilevanti anche nella diagnosi delle lesioni non neoplastiche. Nel periodo dei tre anni in cui si è svolto lo studio i casi pervenuti a tal fine sono stati estremamente rari. Uno degli esempi più importanti riportati in letteratura è sicuramente la valutazione dei markers della popolazione leucocitaria ottenibile attraverso i lavaggi bronchiolo-alveolari (Brogden et al., 1998; Dalquen et al., 1993; Rajamäki et al., 2002; Ren et al., 2006; Tschernig et al., 2001...). Nella nostra esperienza ci

è capitato solo di valutare l'espressione del recettore KIT su una mastocitosi cutanea.

3.4 Conclusioni

La scelta di applicare l'esame immunocitochimico viene fatta partendo dall'osservazione dei preparati citologici colorati con May Grünwald–Giemsa al fine di aumentare il potere diagnostico della citologia. Questo tipo di esame fornisce un valido aiuto alla clinica in quanto permette di ottenere i risultati in tempi brevi, cosa non facilmente ottenibile con l'immunoistochimica.

Tuttavia, affinché l'immunocitochimica possa svolgere efficacemente questo ruolo di supporto è necessario tenere conto di alcuni aspetti:

1. il tipo di campionamento e di fissazione devono poter essere effettuati facilmente dal clinico che intende inviare dei preparati al laboratorio;
2. la tecnica immunocitochimica che viene applicata dovrebbe ridurre al minimo la colorazione di fondo, soprattutto nei preparati con forte contaminazione ematica;
3. la tecnica utilizzata dal laboratorio dovrebbe essere applicabile a tutti i tipi di preparato citologico, inclusi quelli fissati e colorati;
4. il nucleo ed il citoplasma delle cellule devono essere mantenuti nelle migliori condizioni possibili, in modo che sia possibile distinguere morfologicamente le varie popolazioni cellulari presenti sul vetrino e capire a quali di queste appartiene la positività.

Attualmente non esiste una tecnica che riesca a riunire tutti e quattro i punti in maniera efficace: questo è dovuto all'estrema eterogeneità degli anticorpi e degli antigeni che vengono di volta in volta impiegati ed indagati. Inoltre bisogna tenere conto di tutta una serie di altri fattori quali la fissazione, conservazione del materiale citologico e proprietà delle colorazioni citologiche (nei vetri già colorati). E' questo il motivo per cui, prima dell'applicazione alla routine diagnostica, la reattività di ogni anticorpo e di ogni antigene deve essere studiata, osservata e standardizzata in laboratorio.

La possibilità di applicare l'immunocitochimica ai preparati citologici è spesso limitata dall'esigua quantità di campione che viene fatta pervenire al laboratorio. Tuttavia bisogna cercare di osservare sempre le seguenti regole:

1. la valutazione morfologica mediante la citologia normale deve sempre avere la precedenza sull'indagine immunocitochimica;
2. i preparati che vengono assegnati alla valutazione immunologica devono essere stati fissati e stoccati adeguatamente;

3. visto il numero limitato di strisci, l'esame immunocitochimico deve essere pianificato accuratamente al fine di ridurre il pannello anticorpale alle sole incubazioni necessarie;
4. l'esame immunocitochimico dovrebbe venir richiesto solo qualora il problema diagnostico sia stato chiaramente individuato;
5. il pannello anticorpale dovrebbe essere scelto accuratamente cosicchè il test sia in grado di rispondere a più interrogativi diagnostici;
6. dovrebbero essere sempre applicati almeno due anticorpi.

I risultati dei test immunocitochimici devono sempre venire interpretati alla luce dei rilevamenti clinici e morfologici. I test immunologici infatti forniscono solo elementi addizionali a quelli ottenuti tramite la valutazione della morfologia, elementi che servono a dare peso a determinati sospetti diagnostici. Nonostante il fatto che l'immunocitochimica sia solo in grado di "confermare piuttosto che fornire una diagnosi e solo raramente riesca ad indicare la zona di insorgenza di una determinata lesione neoplastica" (Mason et al., 1986), ad oggi questo test risulta essere un valido aiuto alla citologia in quanto in grado di migliorare l'accuratezza diagnostica di questo tipo di indagine.

BIBLIOGRAFIA

Arteaga C.L. (2002): Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol.* 29 (Suppl 14):3-9.

Banks P.M., Caron B.L. and Morgan T.W. (1983): Use of imprints for monoclonal antibody studies: suitability of air-dried preparations from lymphoid tissues with an immunohistochemical method. *Am J Clin Pathol.* 79:438-442

Barsotti G., Marchetti V. and Abramo F. (2007): Primary conjunctival mast cell tumor in a Labrador Retriever. *Vet Ophthalmol.* 10:60-64.

Brogden K.A., Ackermann M. and Huttner K.M. (1998): Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infect Immun.* 66:5948-5954.

Brown R.W. (1994): Practical application of immunocytochemistry in cytology. Presented at Cyto-Teleconferencing 1993-94 Lecture series; American Society of Cytology; 25 gennaio 1994.

Brown D.C., Gatter K.C., Dunnill M.S. and Mason D.Y. (1989): Immunocytochemical analysis of cytocentrifuged fine needle aspirates. A study based on lung tumors aspirated in vitro. *Anal Quant Cytol Histol.* 11:140-145.

Caniatti M., Roccabianca P., Scanziani E., Paltrinieri S. and Moore P.F. (1996): Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol.* 33:204-212.

Chandra M. and Nayar M. (1990): Fc receptors in the differentiation of mesothelial cells from malignant cells in effusions. *Acta Cytol.* 34:582-583.

Chess Q. and Hajdu S.I. (1986): The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytol.* 30:1-7.

Chheda H. and Clarke R.E. (1986): Immunohistochemistry: its use in the diagnosis of epithelial malignancy in serous effusions. *Acta Cytol.* 30:586.

Dalquen P., Sauter G., Epper R., Kleiber B., Feichter G. and Gudat F. (1993): Immunocytochemistry in diagnostic cytology. *Recent Results Cancer Res.* 177: 47-80.

Daste G., Serre G., Mauduyt M.A., Vincent C., Caveriviere P. and Soleilhavoup J.P. (1991): Immunophenotyping of mesothelial cells and carcinoma cells with

monoclonal antibodies to cytokeratins, vimentin, CEA and EMA improves the cytodiagnosis of serous effusions. *Cytopathology*. 2:19-28.

De Nicola D., Regan W.J. (1998): Using cytology in the diagnosis of cancer. In: *Cancer in dogs and cats*. William and Wilkins, Baltimore, 79-94.

Dinges H.P., Wirnsberger G. and Höfler H. (1989): Immunocytochemistry in cytology. Comparative evaluation of different techniques. *Anal Quant Cytol Histol*. 11:22-32.

Dorfman D.M., Bui M.M., Tubbs R.R., Hsi E.D., Fitzgibbons P.L., Linden M.D., Rickert R.R., Roche P.C. and the College of American Pathologists Cell Markers Committee (2006): The CD117 immunohistochemistry tissue microarray survey for quality assurance and interlaboratory comparison: a College of American Pathologists Cell Markers Committee Study. *Arch Pathol Lab Med*. 130:779-782.

Duggan M.A., Masters C.B. and Alexander F. (1987): Immunohistochemical differentiation of malignant mesothelioma, mesothelial hyperplasia and metastatic adenocarcinoma in serous effusions, utilizing staining for carcinoembryonic antigen, keratin and vimentin. *Acta Cytol*. 31:807-814.

Epenetos A.A., Canti G., Taylor-Papadimitriou J., Curling M. and Bodmer W.F. (1982): Use of two epithelium-specific monoclonal antibodies for diagnosis of malignancy in serous effusions. *Lancet*. 2:1004-1006.

Esteban J.M., Yokota S., Husain S., Battifora H. (1990): Immunocytochemical profile of benign and carcinomatous effusions. A practical approach to difficult diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 94:698-705.

Flens M.J., Van der Valk P., Tadema T.M., Huysmans A.C.L.M., Risse E.K.j., Van Tol G.A. and Meijer C.J.L.M. (1990): The contribution of immunocytochemistry in diagnostic cytology. Comparison and evaluation with immunohistology. *Cancer* 65: 2704-2711.

Fitzgibbons P.L., Murphy D.A., Dorfman D.M., Roche P.C., Tubbs R.R., Immunohistochemistry Committee and College of American Pathologists (2006): Interlaboratory comparison of immunohistochemical testing for HER2: results of the 2004 and 2005 College of American Pathologists HER2 Immunohistochemistry Tissue Microarray Survey. *Arch Pathol Lab Med*. 130:1440-1445.

Fowler L.J. and Lachar W.A. (2008): Application of immunohistochemistry to cytology. *Arch Pathol Lab Med*. 132:373-383.

Ghosh A.K., Spriggs A.I., Taylor-Papadimitriou J. and Mason D.Y. (1983): Immunocytochemical staining of cells in pleural and peritoneal effusions with a panel of monoclonal antibodies. *J Clin Pathol.* 36:1154-1164.

Gosh A.K., Spriggs A.I., Charnok M. (1986): Use of immunocytochemical staining to identify cells in peritoneal fluid and washing laparoscopy and laparotomy. *J Clin Pathol* 39:1335-1339.

Griffith G.L., Lumsden J.H. (1984): Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumours. *Vet Clin Pathol.* 13: 13-17.

Guzman J., Costabel U., Bross K.J., Wiehle U., Grunert F. and Schaefer H.E. (1988): The value of the immunoperoxidase slide assay in the diagnosis of malignant pleural effusions in breast cancer. *Acta Cytol.* 32:188-192.

Guzman J., Bross K.J. and Costabel U. (1990a): Malignant pleural effusions due to small cell carcinoma of the lung. An immunocytochemical cell-surface analysis of lymphocytes and tumor cells. *Acta Cytol.* 34:497-501.

Guzman J., Kraft A., Bross K.J., Würtemberger G. and Costabel U. (1990b): Immunocytochemical characterization of malignant pleural effusions of small cell bronchial cancer [Article in German]. *Pneumologie.* 44 Suppl 1:601-602.

Harir N., Pecquet C., Kerenyi M., Sonneck K., Kovacic B., Nyga R., Brevet M., Dhennin I., Gouilleux-Gruart V., Beug H., Valent P., Lassoued K., Moriggl R. and Gouilleux F. (2007): Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood.* 109:1678-1686.

Höinghaus R., Hewicker-Trautwein M. and Mischke R. (2007): Immunocytochemical differentiation of neoplastic and hyperplastic canine epithelial lesion in cytologic imprint preparations. *Vet J.* 173: 81-92.

Höinghaus R., Hewicker-Trautwein M. and Mischke R. (2008): Immunocytochemical differentiation of canine mesenchymal tumors in cytologic imprint preparations. *Vet Clin Pathol.* 37:104-111.

Hsi E.D. (2001): A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 125:289-294.

Jasani B. (2006): United Kingdom External Quality Assurance Schemes for HER2 IHC&FISH: the value of regular participation and educational feedback.

Symposium 22. International Academy of Pathology. 16-21 Settembre 2006, Montreal, Quebec.

Jinno S. and Kosaka T. (2008): Reduction of Iba1-expressing microglial process density in the hippocampus following electroconvulsive shock. *Exp Neurol.* 212:440-447.

Judd M.A. and Britten K.J.M. (1982): Tissue preparation techniques for the demonstration of surface antigens by immunoperoxidase techniques. *Histochem J.* 14:747-753.

Judkins A.R., Montone K.T., LiVolsi V.A. and van de Rijn M. (1998): Sensitivity and specificity of antibodies on necrotic tumor tissue. *Am J Clin Pathol.* 110:641-646.

Kiupel M., Webster J. D., Kaneene J. B., Miller R. and Yuzbasiyan-Gurkan V. (2004): The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol.* 41:371-377.

Kocks C., Hellio R., Gounon P., Ohayon H. and Cossart P. (1993): Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci.* 105:699-710.

Koss L.G. (1990): The future of cytology. The Wachtel lecture for 1988. *Acta Cytol.* 34:1-9.

Kung I.T., Chan S.K. and Lo E.S. (1990): Application of the immunoperoxidase technique to cell block preparations from fine needle aspirates. *Acta Cytol.* 34:297-303.

Kyrkou K.A., Iatridis S.G., Athanassiadou P.P., Emmanouilidou A.G. and Athanassiadis P.P. (1985): Detection of benign or malignant origin of ascites with combined indirect immunoperoxidase assays of carcinoembryonic antigen and lysozyme. *Acta Cytol.* 29:57-62.

Lara-Garcia A., Wellman M., Burkhard M.J., Machado-Parrula C., Valli V.E., Stromberg P.C. and Couto C.G. (2008): Cervical thymoma originating in ectopic thymic tissue in a cat. *Vet Clin Pathol.* 37:397-402.

Layfield L.J., Goldstein N., Perkinson K.R. and Proia A.D. (2003): Interlaboratory variation in results from immunohistochemical assessment of estrogen receptor status. *Breast J.* 9:257-259.

Ledieu D., Palazzi X., Marchal T. and Fournel-Fleury C (2005): Acute megakaryoblastic leukemia with erythrophagocytosis and thrombosis in a dog. *Vet Clin Pathol.* 34:52-56.

Leong A.S.-Y., Suthipintawong C. and Vinyuvat S. (1999): Immunostaining of cytological preparations: a review of technical problems. *Appl Immunohistochem.* 7:214-220.

Leung S.W. and Bédard Y.C. (1996): Immunocytochemical staining on ThinPrep processed smears. *Mod Pathol.* 1996 9:304-306.

Li C.Y., Lazcano-Villareal O., Pierre R.V. and Yam L.T. (1987): Immunocytochemical identification of cells in serous effusions. Technical considerations. *Am J Clin Pathol.* 88:696-706.

Li C.Y., Ziesmer S.C., Wong Y.C. and Yam L.T. (1989): Diagnostic accuracy of the immunocytochemical study of body fluids. *Acta Cytol.* 33:667-673.

Lo H.W., Hsu S.C., Xia W., Cao X., Shih J.Y., Wei Y., Abbruzzese J.L., Hortobagyi G.N. and Hung M.C. (2007): Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* 67:9066-7906.

Lozowski W. and Hajdu S.I. (1987): Cytology and immunocytochemistry of bronchioloalveolar carcinoma. *Acta Cytol.* 31:717-25.

Lung T.Y. (1990): Immunocytochemistry of fine needle aspirates. A tactical approach. *Acta cyt.* 6:789-796

Martin S.E., Moshiri S., Thor A., Vilasi V., Chu E.W. and Schlom J. (1986): Identification of adenocarcinoma in cytopsin preparations of effusions using monoclonal antibody B72.3. *Am J Clin Pathol.* 86:10-8.

Mason M. and Bedrossian C.W.M. (1986): Value of immunocytochemistry in the study of malignant effusions. *Acta Cytol.* 30:569.

Meinkoth J.H., Cowell R.L. (2002a): Sample collection and preparation in cytology: increasing diagnostic yield. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 32: 1187-1207.

Meinkoth J.H., Cowell R.L. (2002b): Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 32: 1209-1235.

Mendelsohn J. and Jose Baselga (2000): The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19:6550-6565.

Meyer D.J. (1996): Diagnostic cytology in clinical oncology. In : Small animal clinical oncology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 43-51.

Mitteldorf C.A., Alves V.A., Kanamura C.T. and Carneiro P.C. (1999): Immunocytochemistry applied to aspiration biopsy cytology. Diagnostic contribution in 100 cases of previously stained, routine specimens. *Acta Cytol.* 43:218-26.

Nadji M. (1980); The potential value of immunoperoxidase techniques in diagnosyc cytology. *Acta Cytol* 24:442-447.

Niemann C.U., Abrink M., Pejler G., Fischer R.L., Christensen E.I., Knight S.D. and Borregaard N. (2007): Neutrophil elastase depends on serglycin proteoglycan for localization in granules. *Blood.* 109:4478-4486.

Orell S.R and Dowling K.D. (1983): Oncofetal antigens as tumor markers in the cytologic diagnosis of effusions. *Acta Cytol.*27:625-629.

Pavlov S.P., Grosheva M., Streppel M., Guntinas-Lichius O., Irintchev A., Skouras E., Angelova S.K., Kuerten S., Sinis N., Dunlop S.A. and Angelov D.N. (2008): Manually-stimulated recovery of motor function after facial nerve injury requires intact sensory input. *Exp Neurol.* 211:292-300.

Permanetter W. and Wiesinger H. (1987): Immunohistochemical study of lysozyme, alpha 1-anti-chymotrypsin, tissue polypeptide antigen, keratin and carcinoembryonic antigen in effusion sediments. *Acta Cytol.* 31:104-112.

Perozo F., Villegas P., Estevez C., Alvarado I.R., Purvis L.B. and Saume E. (2008): Avian adeno-associated virus-based expression of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein for poultry vaccination. *Avian Dis.* 52:253-259.

Piattoni C.V., Blancato V.S., Miglietta H., Iglesias A.A. and Guerrero S.A. (2006): On the occurrence of thioredoxin in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 97:151-60.

Rajamäki M.M., Järvinen A.K., Sorsa T. and Maisi P. (2002): Clinical findings, bronchoalveolar lavage fluid cytology and matrix metalloproteinase-2 and -9 in canine pulmonary eosinophilia. *Vet J.* 163:168-181.

Ramos-Vara (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Veth Pathol.* 42:405-426.

Ren D., Sun R. and Wang S. (2006): Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1--induced acute lung injury. *Inflamm Res.* 55:207-215.

Sabattini S., Bettini G. (2009): An Immunohistochemical Analysis of Canine Haemangioma and Haemangiosarcoma. *J Comp Pathol.* 140:158-168.

Sneige N. (2006): Hormone receptor analysis of breast cancer: current issues. Symposium 27. International Academy of Pathology. 16-21 Settembre 2006, Montreal, Quebec.

Stanzel R.D., Lourenssen S. and Blennerhassett M.G. (2008): Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon. *Exp Neurol.* 211:203-213.

St.-Laurent J., Boulay M.-E., Prince P., Bissonnette E. and Boulet L.-P. (2006): Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens : An immunocytochemical analysis. *J Immunol Methods.* 308:36-42

Suthipintawong C., Leong A.S. and Vinyuvat S. (1996): Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol.* 15:167-174.

Swanson P.E. (1993): Diagnostic immunohistochemistry. A practical primer for the benighted bureaucrat. *Am J Clin Pathol.* 99:530-532.

Swanson P.E. and Schmidt R.A. (2005): Beneath the surface of the mud, part II: the dichotomization of continuous biologic variables by maximizing immunohistochemical method sensitivity. *Am J Clin Pathol.* 123:9-12.

Szpak C.A., Johnston W.W., Lottich S.C., Kufe D., Thor A. and Schlom J. (1984): Patterns of reactivity of four novel monoclonal antibodies (B72.3, DF3, B1.1 and B6.2) with cells in human malignant and benign effusions. *Acta Cytol.* 28:356-367.

Szpak C.A., Soper J.T., Thor A., Schlom J. and Johnston W.W. (1989): Detection of adenocarcinoma in peritoneal washings by staining with monoclonal antibody B72.3. *Acta Cytol.* 33:205-214.

Takauji S.R., Watanabe M., Uyama R., Nakagawa T., Miyajima N., Mochizuki M., Nishimura R., Sugano S. and Sasaki N. (2007): Expression and subcellular

localization of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in 8 feline mammary tumor cell lines. *J Vet Med Sci.* 69:831-834.

Tickman R.J., Cohen C., Varma V.A., Fekete P.S. and DeRose P.B. (1990): Distinction between carcinoma cells and mesothelial cells in serous effusions. Usefulness of immunohistochemistry. *Acta Cytol.* 34:491-496.

To A., Coleman D.V., Dearnaley D.P., Ormerod M.G., Steele K. and Neville A.M. (1981): Use of antisera to epithelial membrane antigen for the cytodiagnosis of malignancy in serous effusions. *J Clin Pathol.* 34:1326-1332.

Tschernig T, Hoffmann A, Pabst R (2001): Local proliferation contributes to lymphocyte numbers in normal lungs *Exp Toxicol Pathol.* 53:187-194.

Van Ewijk W., Van Soest P. L., Verkerk A. and Jongkind J. F. (1983): Loss of antibody binding to prefixed cells: Fixation parameters for immunocytochemistry. *Histochem J.* 16:179-193.

Vilches-Moure J.G. and Ramos-Vara J.A. (2005): Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissues. *J Vet Diagn Invest.* 17:346-350.

Waltz A.E. and Said J.W. (1983): Specific tumor markers in diagnostic cytology. Immunoperoxidase studies of carcinoembryonic antigen, lysozyme and other tissue antigens in effusions, washes and aspirates. *Acta Cytol.* 27:408-416.

Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J.B., Miller R.A., Resau J.H. and Kiupel M. (2006): The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia.* 8:104–111.

Wick M.R. and Swanson P.E. (2002): Targeted controls in clinical immunohistochemistry: a useful approach to quality assurance. *Am J Clin Pathol.* 117:7-8.

Wilbur D.C. (1993): Technical considerations in the application of immunocytochemistry to cytology. Cytology update – Short Course, presented at 82nd Annual meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, Marzo 1993; New Orleans.

4. CASI CLINICI

4.1 Versamento di origine carcinomatosa

Riassunto

Viene presentato il caso di un versamento pleurico causato da emboli carcinomatosi provenienti da un adenocarcinoma mammario in un cane meticcio femmina di 9 anni che presentava una diagnosi iniziale di processo infiammatorio cronico con intensa reattività mesoteliale. Al fine di raggiungere la diagnosi corretta è stato necessario ricorrere all'immunofenotipizzazione delle cellule atipiche presenti all'interno del versamento stesso, che si sono dimostrate negative alla mesotelina, all'antigene comune mielo-istiocitario, al lisozima ed alla vimentina e positive alla pancitocheratina ed alla citocheratina 19.

Introduzione

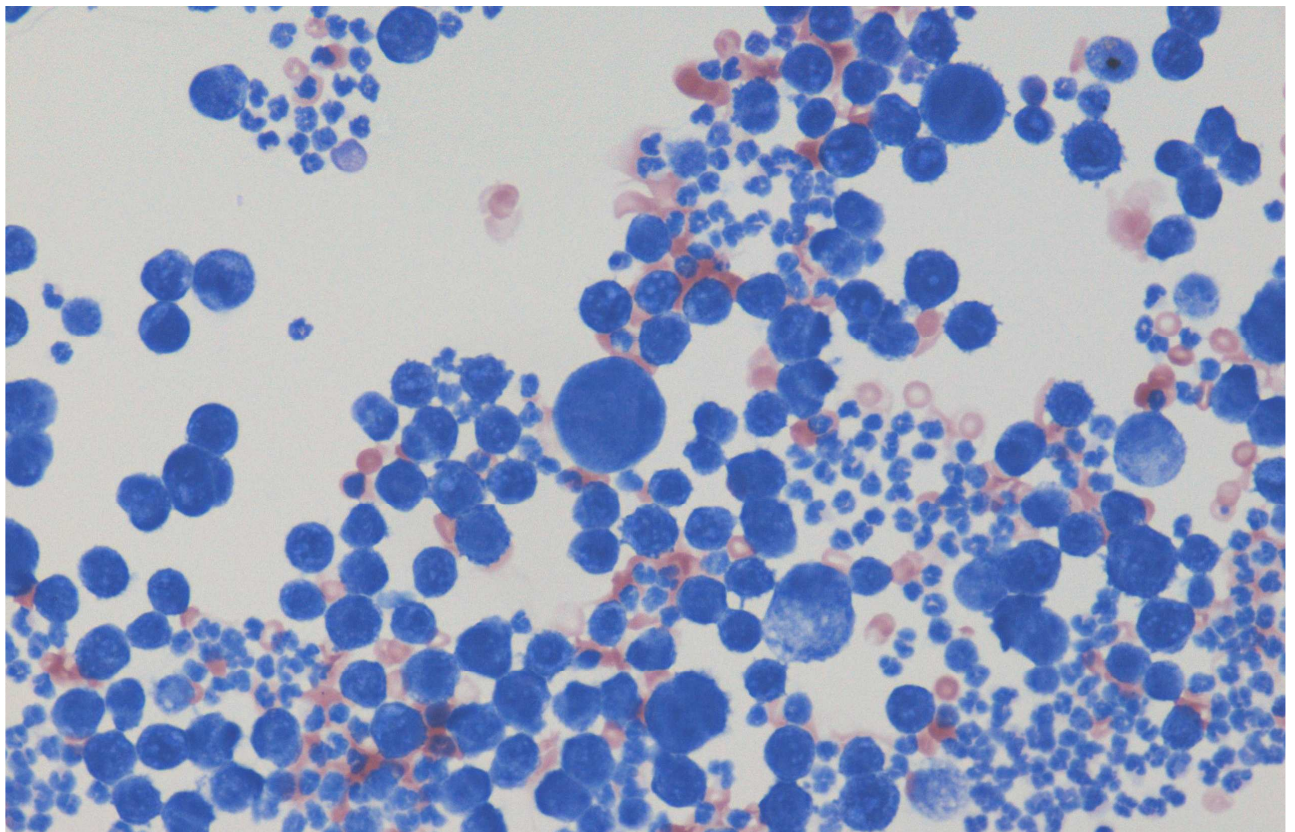
In ambito pleurico le infiammazioni sono le evenienze patologiche più frequenti. Le pleure infatti vengono facilmente interessate per continuità da situazioni patologiche dei polmoni, o per contiguità ad altri organi vicini. Agenti flogogeni infettivi possono raggiungere la pleura per via ematica, linfatica o veicolati da corpi estranei provenienti dall'esofago. Oltre alle cause infettive, che sono predominanti, talvolta le pleuriti riconoscono cause non infettive quali ad esempio le neoplasie. Oltre al mesotelioma, le neoplasie che colpiscono la pleura sono in genere carcinomi che vi si insediano per infiltrazione diretta da carcinomi polmonari periferici o che metastatizzano per via linfatica dal polmone o dalla cavità addominale. Occasionalmente le più varie neoplasie maligne possono metastatizzare alla pleura per via ematogena (Marcato, 2002).

In questo lavoro vengono descritti i vantaggi dell'applicazione della metodica immunocitochimica ai preparati ottenuti da versamenti pleurici al fine del raggiungimento della diagnosi delle patologie che si possono sviluppare in questa sede.

Caso clinico

Un cane meticcio femmina di 9 anni è stato portato alla visita all'Ospedale didattico della Facoltà di medicina veterinaria di Bologna ad Ozzano dell'Emilia in seguito a recenti episodi di difficoltà respiratoria. Mediante un'indagine radiografica del torace è stata dimostrata la presenza di un versamento pleurico bilaterale di natura da accertare e si è proceduto all'aspirazione del liquido al fine di procedere con un esame citologico. L'osservazione dei preparati, ottenuti tramite sedimentazione per centrifugazione e colorati con May Grünwald – Giemsa, metteva in luce la presenza negli strisci di numerosi granulociti neutrofili non degenerati multisegmentati e di cellule mesoteliali raggruppate in ammassi papilliformi con intensi aspetti di reattività. L'interpretazione diagnostica del quadro citologico alla prima lettura è stata di processo infiammatorio cronico con intensa reattività mesoteliale.

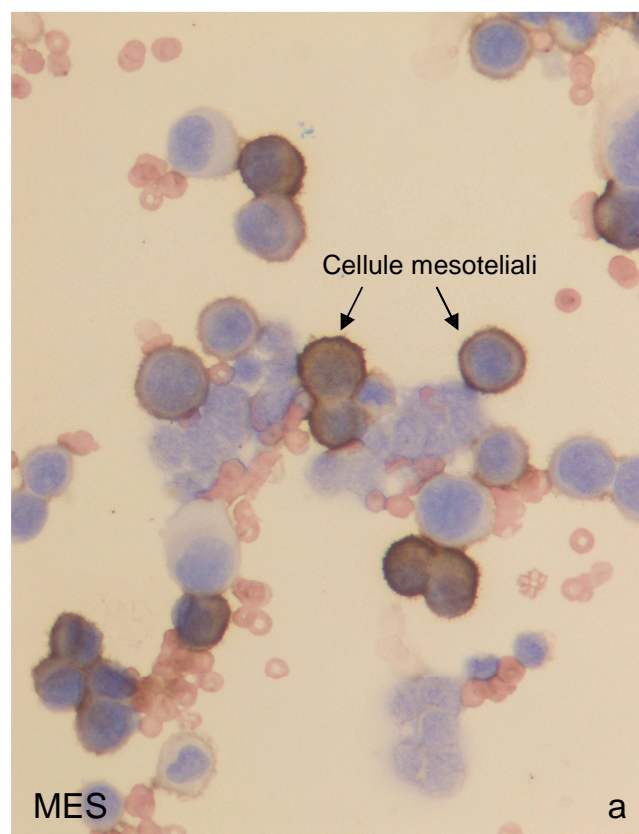
Figura 26: Preparato citologico del versamento colorato con May Grünwald–Giemsa (Ob. 40x).

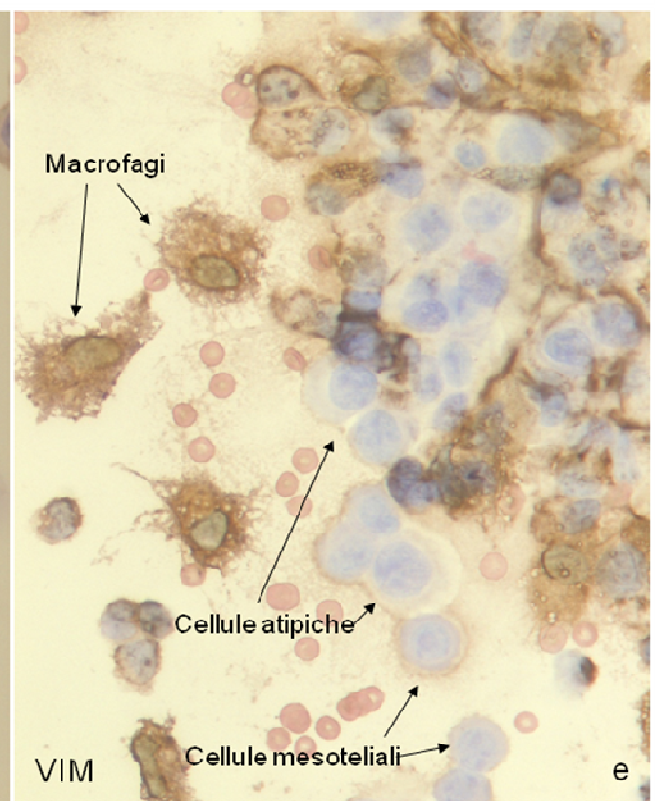
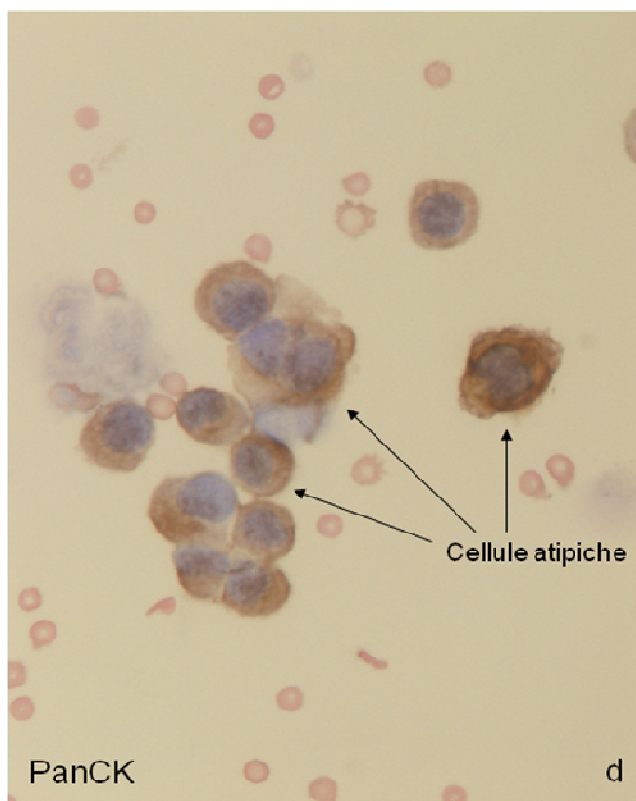
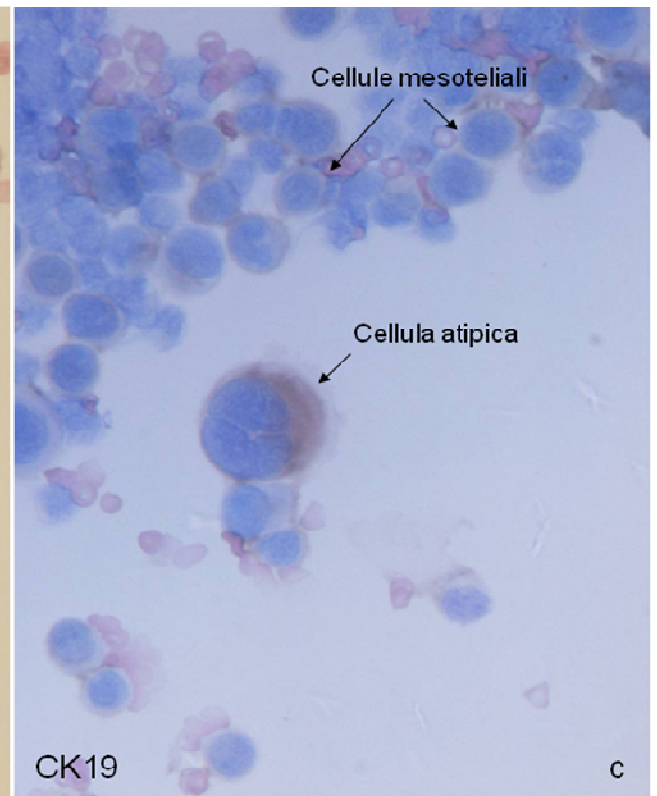
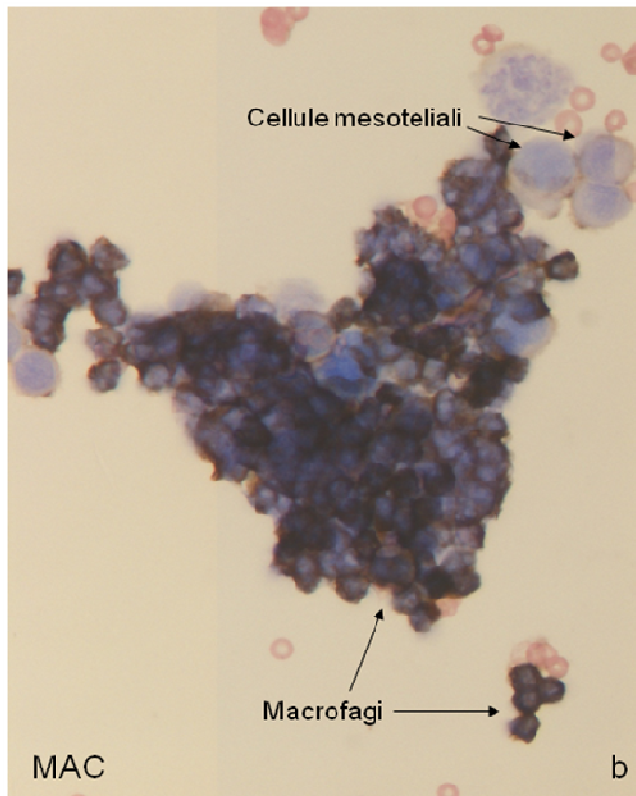


Il cane è stato quindi sottoposto ad una terapia antinfiammatoria che non ha prodotto miglioramenti e dopo una settimana è stato effettuato un nuovo campionamento del liquido pleurico. Il campione è stato suddiviso in aliquote ed è stato allestito tramite citospin, fissato in acetone e sottoposto ad indagine immunocitochimica per i markers pancitocheratina, mesotelina, vimentina, antigene comune mielo-istiocitario (MAC), lisozima e citocheratina 19. Le cellule atipiche presenti all'interno del liquido sono risultate positive alla pancitocheratina ed alla citocheratina 19, mentre sono risultate negative per gli altri antigeni. Questo ha permesso di identificarle come cellule tumorali carcinomatose provenienti probabilmente da un adenocarcinoma mammario (l'animale presentava da almeno un anno dei noduli mammari disseminati di piccole dimensioni). L'animale è stato poi sottoposto ad una toracotomia esplorativa al fine di constatare la gravità del quadro clinico ed è stato soppresso in sede operatoria in quanto non operabile.

Figura 27: Reazioni delle cellule presenti nel preparato al pannello anticorpale testato (Ob. 40x).

- a)** positività citoplasmatica delle cellule mesoteliali all'anticorpo anti-mesotelina (MES),
- b)** positività citoplasmatica dei macrofagi all'anticorpo anti-antigene comune mielo-istiocitario (MAC),
- c)** positività citoplasmatica delle cellule atipiche alla citocheratina 19 (CK19). Nella foto è visibile anche una debole positività aspecifica delle cellule mesoteliali,
- d)** positività citoplasmatica delle cellule atipiche all'anticorpo anti-pancitocheratina (PanCK),
- e)** positività citoplasmatica dei macrofagi all'anticorpo anti vimentina (VIM). Nella foto è possibile notare una debole positività delle cellule mesoteliali.





Discussione

I versamenti sono una delle manifestazioni più comuni dei tumori primitivi e metastatici a carico delle pleure. L'esame citologico dell'essudato pleurico

rappresenta la prima indagine diagnostica che viene attuata in questi pazienti. L'identificazione delle cellule neoplastiche all'interno dei campioni di versamento mediante la citologia rappresenta un fattore cruciale, sia dal punto di vista dell'invasività del campionamento, sia dal punto di vista del costo dell'esame, ma soprattutto dal punto di vista precocità della diagnosi che permette di passare rapidamente allo staging, alla formulazione della prognosi e del trattamento del tumore (Bottles et al., 1991; DiBonito et al., 1993; Kho-Duffin et al., 1998; Pedio et al., 1988; Pomjanski et al., 2001; Renshaw et al., 1997; Stevens et al., 1992).

Alcuni pazienti con versamento causato da neoplasie presentano una storia clinica di tumori maligni pregressi, tuttavia in alcuni casi il riscontro di cellule tumorali all'interno di un essudato pleurico può rappresentare il primo segno di un tumore non ancora manifesto (Telma et al., 2006).

Una diagnosi precoce ed accurata può permettere, in questi casi, l'approntamento per tempo di una terapia adeguata e quindi anche ad una prognosi più favorevole (DiBonito et al., 1993; Kho-Duffin et al., 1998).

Tuttavia la differenziazione, all'interno di questi campioni, tra mesotelioma, mesotelio reattivo e metastasi di adenocarcinoma rappresenta una vera e propria sfida diagnostica (Bedrossian 1998; Berge et al., 1965; Cakir et al., 2008; Kitazume et al., 2000; Stevens et al., 1992). Infatti, nonostante nel campo dei versamenti la citologia sostituisca l'istologia (Stevens et al., 1992), la distinzione tra le tre patologie sopracitate rappresenta una delle incertezze maggiori per un citologo. La differenziazione su base esclusivamente citomorfologica è, a tutti gli effetti, un problema, ma è tuttavia possibile affiancare alcune indagini più sofisticate. La preparazione di citoinclusi, la citochimica e l'immunocitochimica consentono infatti di ottenere informazioni aggiuntive molto utili ai fini diagnostici (Cakir et al., 2008).

In questo caso era presente un versamento pleurico che, alla prima analisi citologica, aveva fatto pensare ad una pleurite a causa della presenza negli strisci di numerosi granulociti neutrofili non degenerati multisegmentati e di cellule mesoteliali con aspetti di reattività. Tuttavia, nonostante la terapia mirata, la sintomatologia si è aggravata nel corso di una singola settimana e, sebbene se la presenza dei noduli mammari inducesse a pensare ad una causa neoplastica, la revisione dei semplici preparati citologici allestiti non era in grado di fornire elementi validi a supportare questo sospetto diagnostico.

La discrepanza tra la diagnosi e la risposta alla terapia ha quindi portato alla richiesta di un approfondimento immunocitochimico sui campioni.

Le cellule mesoteliali sono positive alla pancitocheratina, alla mesotelina ed alla vimentina. Le cellule infiammatorie, soprattutto i macrofagi, che talvolta possono assumere forme ambigue in seguito alla loro attivazione, sono positive all'antigene comune mielo-istiocitario, al lisozima ed alla vimentina (solo i macrofagi). Le cellule epiteliali infine sono positive alla pancitocheratina e, se di origine da un epitelio non squamoso, alla citocheratina 19.

Tabella 15: Positività attesa delle cellule carcinomatose, delle cellule mesoteliali e delle cellule infiammatorie al pannello anticorpale testato.

	PanCK	CK19	LIS	MAC	MES	VIM
Cellule carcinomatose	+	+/-	-	-	-	-
Mesotelio	+	-	-	-	+	+
Macrofagi	-	-	+	+	-	+

In questo caso erano presenti cellule atipiche che manifestavano una forte positività alla pancitocheratina ed alla citocheratina 19, cosa che ha permesso di identificarle come di origine ghiandolare, avvalorando l'ipotesi della metastasi da uno dei noduli mammari. Le cellule mesoteliali ed i macrofagi, evidenziati dalla reazione positiva degli altri anticorpi, presentavano caratteri di attivazione ma non di atipia.

Conclusioni

E' stato descritto un caso di versamento pleurico e pleurite causate da metastasi di carcinoma. Sebbene versamenti e pleuriti settiche e neoplastiche abbiano una sintomatologia sovrapponibile, la prognosi e la terapia sono completamente differenti per cui una diagnosi eziopatologica precisa, per questi casi, è necessaria. La caratterizzazione immunofenotipica delle cellule che esfoliano naturalmente all'interno dei versamenti risulta estremamente utile al momento di esprimere il giudizio diagnostico, viste le difficoltà che la semplice discriminazione su base citomorfologica trova nell'interpretazione di tali preparati.

BIBLIOGRAFIA

Bedrossian C.W.M. (1998): Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 19:131–137.

Berge T. and Grontoft O. (1965): Cytologic diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Acta Cytol* 9:207–212.

Bottles K., Reznicek M.J., Holly E.A., Ahn D.K., Layfield L.J. and Cohen M.B. (1991): Cytologic criteria used to diagnose adenocarcinoma in pleural effusions. *Mod Pathol* 4:677–681.

DiBonito L., Falconieri G., Colautti I., Bonifacio Gori D., Dudine S. and Giarelli L. (1993): Cytopathology of malignant mesothelioma: A study of its patterns and histological bases. *Diagn Cytopathol* 9:25–31.

Cakir E., Demirag F., Aydin M. and Unsal E. (2008): Cytopathologic Differential Diagnosis of Malignant Mesothelioma, Adenocarcinoma and Reactive Mesothelial Cells: A Logistic Regression Analysis. *Diagn Cytopathol* 37:4-10.

Kho-Duffin J., Tao L.-C., Cramen H., Catellier M.J., Irons D. and Ng P. (1998): Cytologic diagnosis of malignant mesothelioma, with particular emphasis on the epithelial non cohesive cell type. *Diagn Cytopathol* 20:57–62.

Kitazume H., Kitamura K., Mukai K., Inayama Y., Kawano N., Nakamura N., Sano J., Mitsui K., Yoshida S. and Nakatani Y. (2000): Cytologic differential diagnosis among reactive mesothelial cells, malignant mesothelioma and adenocarcinoma. Utility of combined E-cadherin and calretinin immunostaining. *Cancer Cytopathol* 90:55–60.

Pedio G. and Landolt-Weber U. (1988): Cytologic presentation of malignant mesothelioma in pleural effusions. *Expl Cell Biol* 56:211–216.

Pomjanski N., Motherby H., Buckstegge B., Knops K., Rohn B.L. and Böcking A. (2001): Early Diagnosis of mesothelioma in serous effusions using AGNOR analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 23:151–160.

Renshaw A.A., Dean B.R., Antman K.H., Sugarbaker D.J. and Cibas E.S. (1997): The role of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Chest* 111:106–109.

Stevens M.W., Leong A.S., Fazzalari N.L., Dowling K.D. and Henderson D.W. (1992): Cytopathology of malignant mesothelioma: A stepwise logistic regression analysis. *Diagn Cytopathol* 8:333–341.

Telma P.C., Reda S.S., Yulin L. and Silverman J.F. (2006): The diagnosis of malignancy in effusion cytology: A pattern recognition approach. *Adv Anat Pathol* 13:174–184.

4.2 Sinoviosarcoma

Riassunto

Viene riportato il caso di un gatto europeo maschio castrato di 12 anni presentante una zoppia causata da un sinoviosarcoma a livello di garretto destro. Per raggiungere la certezza della diagnosi in questa particolare neoplasia si è ricorsi all'immunofenotipizzazione delle cellule raccolte mediante agoaspirazione dalla lesione. Le cellule sono risultate positive alla pancitocheratina, alla citocheratina 19 ed alla vimentina.

Introduzione

I tumori di origine articolare sono rari e, per la maggior parte, maligni. Quelli riportati nella letteratura veterinaria sono quasi esclusivamente sinoviosarcomi del cane (Allemand et al., 1998; Whitelock et al., 1997). Il sinoviosarcoma è stato riportato raramente anche nei gatti, nei bovini, nei cavalli ed in altre specie (Theilen et al., 1987) e rappresenta l'8% dei sarcomi dei tessuti molli nell'uomo. Nei cani coinvolge più frequentemente il garretto ed il gomito, anche se altri autori riportano anche altre localizzazioni quali, ad esempio a livello di anca (Karayannopoulou et al., 1992).

Malgrado si assuma che il sinoviosarcoma sia di origine mesenchimale e nonostante il tumore presenti delle similitudini con il tessuto sinoviale normale, l'istogenesi di questo tumore non è, ad oggi, ancora ben definita (Panayiotis et al., 2004). Microscopicamente può essere caratterizzato da un pattern cellulare mono o bifasico, di cui il bifasico è diagnosticamente meglio definibile in quanto comprende sia una componente sarcomatosa sia una componente epitelioidale, che può organizzarsi in cordoni e pseudoacini (Palmer, 1993). Il sinoviosarcoma deve essere messo in diagnosi differenziale dal sarcoma istiocitario, dal fibrosarcoma, dall'osteosarcoma e dal tumore a cellule giganti dei tessuti molli (Cole et al., 1999; Taconis et al., 1997). Di conseguenza esso può rappresentare un complesso problema diagnostico ed essere quindi sottostimato, soprattutto nelle varianti atipiche e monofasiche o nei casi in cui siano presenti metaplasie ossee o zone di

calcificazione. Ad oggi, in veterinaria il profilo immunoistochimico del sinoviosarcoma non è stato ancora chiaramente definito (Panayiotis et al., 2004).

In questo lavoro si vuole mostrare come l'applicazione di un pannello anticorpale anche di ridotte dimensioni possa aiutare in maniera considerevole il citologo al momento della diagnosi di una neoplasia rara e particolare come il sinoviosarcoma.

Caso clinico

Un gatto europeo maschio castrato di 12 anni viene portato alla visita dal veterinario a causa di una zoppia di 4° grado a carico dell'arto posteriore destro. Il veterinario emette una diagnosi radiografica di osteomielite e l'animale viene sottoposto a terapia antibiotica. Dopo una settimana, durante la quale la sintomatologia del gatto non migliora, l'animale viene sottoposto ad una seconda indagine radiografica da parte di un altro veterinario e questi diagnostica una frattura ed un'infezione a carico del garretto. L'animale viene quindi trattato con infiltrazione endoarticolare di antinfiammatori e condroprotettori (Zeel).

Un mese dopo l'inizio della nuova terapia l'animale viene portato per una visita all'Ospedale didattico della Facoltà di medicina veterinaria di Bologna ad Ozzano dell'Emilia con i muscoli dell'arto malato ormai ipotrofici a causa del mancato appoggio. Viene effettuato un esame ecografico del garretto che rivela un ispessimento dall'aspetto disomogeneo, sormontato da una raccolta liquida, della calotta calcaneale di natura da accertare. Dopo campionamento mediante agoaspirazione, il campione viene colorato con May Grünwald – Giemsa e viene emesso un sospetto di sarcoma di possibile origine sinoviale.

Alcuni degli strisci vengono fissati in acetone freddo (4°C) e sottoposti ad indagine immunocitochimica per la valutazione dell'espressione della pancitocheratina AE1/AE3, della citocheratina 19 e della vimentina, che risultano tutti positivi. I risultati ottenuti supportano la diagnosi di sinoviosarcoma bifasico. Viene effettuata la stadiazione clinica della neoplasia e la radiografia toracica evidenzia la presenza di numerose opacità rotondeggianti con centro iperdiafano diffuse ad entrambi i campi polmonari, rendendo quindi inutile qualsiasi approccio chirurgico alla lesione del garretto. Dopo una rapida degenerazione delle condizioni di vita, l'animale viene soppresso a 10 giorni dalla diagnosi. La necropsia effettuata sull'animale e l'istologia condotta sui tessuti prelevati conferma la diagnosi

immunocitochimica di sinoviosarcoma e quella radiografica di metastasi polmonari. In tal sede vengono inoltre messe in evidenza la presenza di metastasi anche a livello di linfonodo regionale, linfonodi iliaci mediali, lombo-aortici e mesenterici-duodenali, mediastinici e tracheo-bronchiali, di parete gastrica, reni, miocardio e muscolatura cervicale.

Figura 28: Preparato citologico (striscio da ago aspirato) colorato con May Grünwald–Giemsa

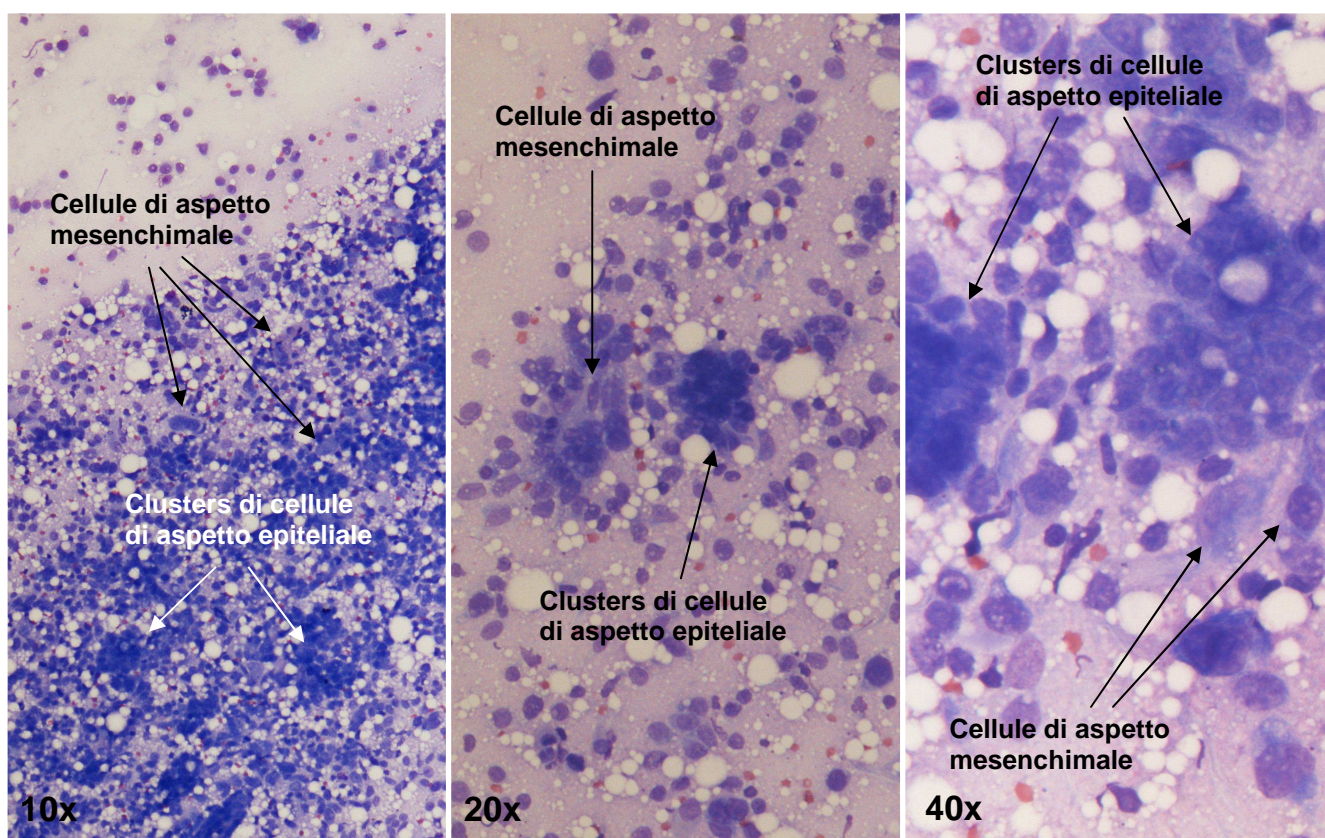
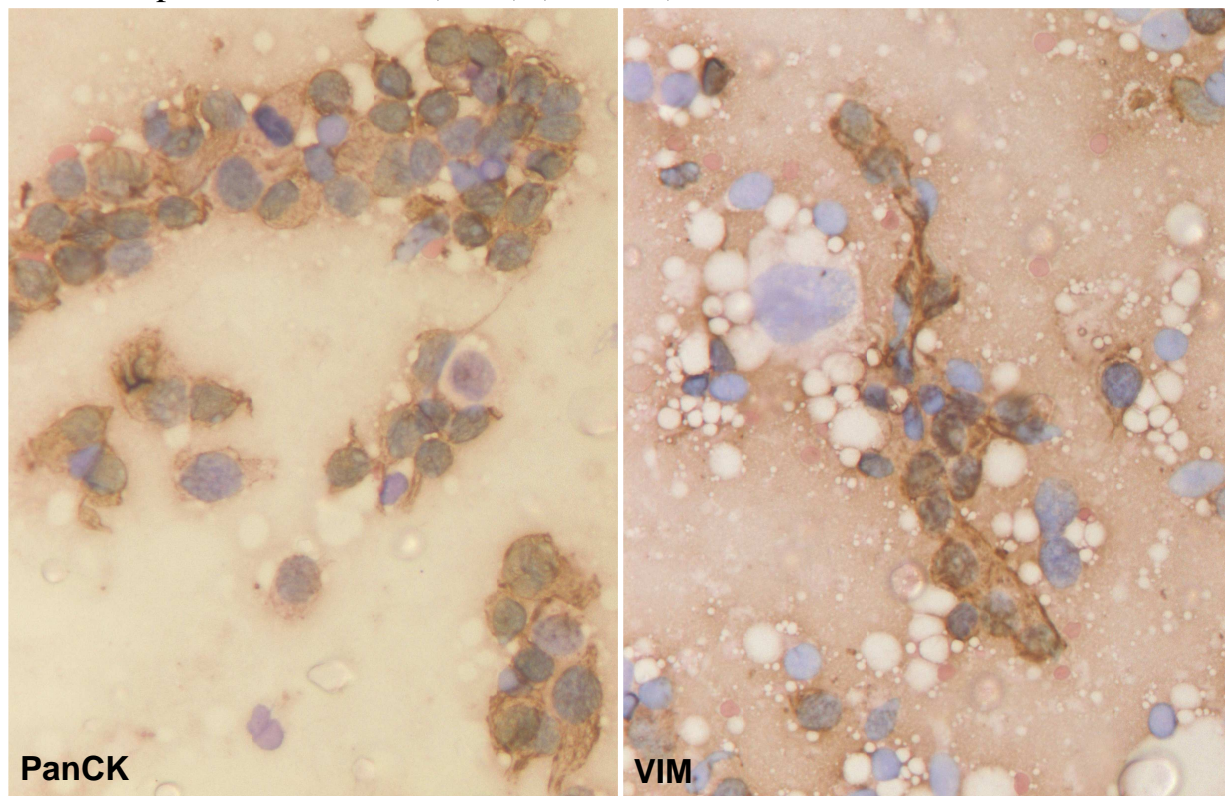


Figura 29: Reazioni delle cellule presenti nel preparato al pannello anticorpale testato (Ob. 40x): a sinistra è dimostrata la positività citoplasmatica delle cellule della componente epiteliale all'anticorpo anti-pancitocheratina (PanCK), a destra la positività citoplasmatica delle cellule della componente mesenchimale all'anticorpo anti vimentina (VIM) (Ob. 40x).



Discussione

Il sinoviosarcoma è un tumore poco frequente che si può presentare nella variante monofasica mesenchimale o nella bifasica mesenchimale ed epiteliale (Panayiotis et al., 2004). L'istogenesi, la patogenesi ed il profilo immunologico di questa neoplasia non sono ancora stati definiti chiaramente (Panayiotis et al., 2004) e la letteratura veterinaria che tratta di questo soggetto è piuttosto scarsa (Allemand et al., 1998). Nel caso qui presentato viene sviluppato il profilo immunocitochimico di un sarcoma sinoviale bifasico in un gatto anziano e tale profilo viene discusso in base alle possibili diagnosi differenziali.

Il sinoviosarcoma viene generalmente riportato in cani adulti maschi di grossa taglia (McGlennon et al., 1988), tuttavia il soggetto descritto in questo studio era un gatto anziano. La zoppia è un segno clinico comune in tutti i casi e può durare

da settimane a mesi (Panayiotis et al., 2004). In questo caso l'animale, al momento della prima visita, non appoggiava già più il peso sull'arto colpito.

La presenza di una massa a carico dei tessuti molli periarticolari spesso è l'unico indizio radiografico riscontrabile e la prima alterazione scheletrica solitamente visibile è una reazione periostale con un assottigliamento della porzione corticale (Lipowitz et al., 1979). Questo quadro progredisce quindi con aree di osteolisi, dai margini indefiniti, delle lamine e delle trabecole (Gibbs et al., 1985). La neoplasia solitamente colpisce tutta l'articolazione, coinvolgendo tutte le ossa che la compongono (McGlennon et al., 1988). Molti pazienti affetti da sinoviosarcoma sviluppano metastasi (Vail et al., 1994). L'amputazione, la resezione chirurgica e la chemioterapia sono le opzioni terapeutiche possibili, tuttavia l'amputazione dell'arto colpito, laddove possibile, sembra essere la soluzione più efficace (Panayiotis et al., 2004; Vail et al., 1994). In questo caso erano già presenti metastasi sparse documentate per cui non si è potuto procedere alla soluzione chirurgica.

L'aspetto citologico (cellule mesenchimali atipiche isolate ed in ammassi) permetteva di considerare nella diagnosi differenziale il sarcoma istiocitario, il fibrosarcoma, l'osteosarcoma e il tumore a cellule giganti dei tessuti molli.

Il profilo immunocitochimico del tumore, tuttavia, era fortemente indicativo per la diagnosi di sinoviosarcoma. La positività delle cellule tumorali alla vimentina era indicativa della loro derivazione mesenchimale (Spangler et al., 1994). Le cellule tumorali erano, inoltre, positive alla pancitocheratina ed alla citocheratina 19, il che dimostrava il carattere bifasico della neoplasia ed escludeva tutte le altre ipotesi prese in considerazione nella diagnosi differenziale.

Conclusioni

E' stato descritto un caso di zoppia causata da un sarcoma di origine sinoviale in un gatto anziano. Sebbene la sintomatologia clinica ed i reperti ecografici, radiografici e citologici di questo tumore siano spesso sovrapponibili a quelli di altri tumori di origine mesenchimale o istiocitaria, il profilo antigenico del sinoviosarcoma bifasico costituisce una chiave di volta abbastanza affidabile per giungere alla diagnosi di questa neoplasia poco frequente. L'applicazione di una metodica immunocitochimica all'iter diagnostico laddove esista un sospetto di

sinoviosarcoma rappresenta quindi un valido elemento di supporto per il patologo, soprattutto in casi come questo in cui non è possibile ottenere un campione di tessuto per procedere con l'istologia.

BIBLIOGRAFIA

Allemand V., Asimus E., Delverdier M., Pages C., Mathon D. and Autefage A. (1998): Synovial sarcoma in dogs: a review and study of two patients. *Revue Med Vet*, 149:123-134.

Cole P., Ladanyi M., Gerald W.L., Cheung N.K.V., Kramer K., LaQuaglia M.P. and Kushner B.H. (1999): Synovial sarcoma mimicking desmoplastic small round-cell tumor: critical role for molecular diagnosis. *Med Pediatr Oncol* 32:97-101.

Gibbs C., Denny H.R. and Lucke V.M. (1985): The radiological features of non-osteogenic malignant tumours of bone in the appendicular skeleton of the dog: a review of thirty-four cases. *J Small Anim Pract* 26:537-553.

Lipowitz A.J., Fetter A.W. and Walker M.D. (1979): Synovial sarcoma of the dog. *J Am Vet Med Assoc* 174:76-81.

Karayannopoulou M., Kaldrimidou E. and Dessiris A. (1992): Synovial sarcoma in a dog. *J Vet Med A* 39:76-80.

McGlennon N.J., Houlton J.E.F. and Gorman N.T. (1988): Synovial sarcoma in the dog- a review. *J Small Anim Pract* 29:139-152.

Palmer N. (1993): Tumors of joints. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds.). *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 1, p. 181. Academic Press, San Diego.

Panayiotis L., Hock G.H. and Habibah A. (2004): Canine biphasic synovial sarcoma: case report and immunohistochemical characterization. *J Vet Sci* 5:173-180.

Spangler W.L., Culbertson M.R. and Kass P.H. (1994): Primary mesenchymal (nonangiomatous/nonlymphomatous) neoplasms occurring in the canine spleen: anatomic classification, immunohistochemistry, and mitotic activity correlated with patient survival. *Vet Pathol* 31:37-47.

Taconis W., Van der Heul R. and Taminiau A. (1997): Synovial chondrosarcoma: report of a case and review of the literature. *Skeletal Radiol* 26:682-685.

Theilen G.H. and Madewell B.R. (1987): Tumors of the skeleton, In: Theilen GH, Madewell BR (eds.). *Veterinary Cancer Medicine*. Vol. 2:471-498, Lea & Febiger, Philadelphia.

Vail D.M., Powers B.E., Getzy D.M., Morrison W.B., McEntee M.C., O'Keefe D.A., Norris A.M. and Withrow S.J. (1994): Evaluation of prognostic factors for dogs with synovial sarcoma: 36 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc* 205:1300-1307.

Whitelock R.G., Dyce J., Houlton J.E.F. and Jefferies A.R. (1997): A review of 30 tumours affecting joints. *Vet Comp Orthop Traumatol* 10:146-152.

4.3 Sarcoma istiocitario

Riassunto

Viene documentato il caso di un cane Labrador retriever femmina di 4 anni affetto da un sarcoma istiocitario metastatico che aveva causato un versamento addominale e pericardico.

Al fine di ottenere una diagnosi precisa di sarcoma istiocitario è stata necessaria l'applicazione dell'indagine immunocitochimica, nella quale le cellule del versamento sono state testate per i markers CD3, CD79 α , CD117, antigene comune mielo-istiocitario (MAC), mesotelina (MES), pancitocheratina (PanCK), lisozima (LIS) e vimentina (VIM).

Introduzione

Il sarcoma istiocitario è un tumore istiocitico maligno localizzato o sistemico (Ghisleni et al, 2006).

La forma localizzata è caratterizzata dal coinvolgimento di una sola area corporea, di solito il sottocute delle estremità, spesso vicino ad una articolazione (sarcoma sinoviale di origine istiocitaria). Più raramente, possono essere influenzati milza, midollo osseo, polmoni, lingua, cavità nasali, ossa (vertebre), articolazioni ed encefalo (Ghisleni et al, 2006). Si tratta di un tumore molto invasivo, che tende ad interessare anche derma, strato muscolare e scheletro e che può metastatizzare ai linfonodi regionali, al fegato, ai polmoni (se il sito primitivo è splenico) ed ai linfonodi ilari (se il sito primitivo è polmonare) (Marcato, 2002).

Il sarcoma istiocitario disseminato, chiamato fino a poco tempo fa istiocitosi maligna, è una malattia rara, fatale per il paziente, caratterizzata da una rapida ed incontrollata proliferazione di istiociti atipici maligni di diversi siti contemporaneamente. L'istiocitosi maligna interessa primariamente la milza, i polmoni, il midollo osseo, il fegato ed i linfonodi. Altri organi che possono essere colpiti sono il sistema nervoso centrale, i reni, la muscolatura scheletrica, lo stomaco e i surreni. La cute e il sottocute, seppure raramente, possono essere coinvolti (Ghisleni, 2006).

Lo scopo di questo lavoro è dimostrare quanto l'indagine immunocitochimica possa risultare utile alla diagnosi di patologie neoplastiche una volta affiancata ad una corretta diagnosi differenziale ottenuta dalla citologia di un versamento.

Caso clinico

Un cane Labrador retriever femmina di 4 anni viene condotto alla visita veterinaria a causa dell'aumento di volume dell'addome. La visita diagnostica la presenza di un'ascite e di una epatosplenomegalia, inoltre l'auscultazione del torace evidenzia un'attenuazione dei toni cardiaci. L'animale viene sottoposto quindi ad una indagine ecografica cardiaca, che mostra la presenza di un versamento pericardico, ed addominale, che conferma l'ascite e l'epatosplenomegalia diagnosticate alla palpazione ed esclude la presenza di masse in fegato e milza.

Viene effettuata la centesi del liquido pericardico e, su questo, viene effettuato un esame citologico che rivela la presenza di cellule atipiche dalla morfologia rotondocellulare.

Da una parte del liquido aspirato vengono allestiti, tramite centrifugazione, dei vetri su cui viene testata la presenza dei markers immunocitochimici CD3, CD79 α , CD117, antigene comune mielo-istiocitario, mesotelina, pancitocheratina, lisozima e vimentina al fine di individuare la natura di questa neoplasia. Le cellule atipiche risultano positive all'antigene comune mielo-istiocitario, al lisozima ed alla vimentina e negative a tutti gli altri markers, dimostrando una derivazione istiocitaria della neoplasia.

In attesa della diagnosi immunocitochimica, che arriverà 3 settimane dopo la visita, l'animale viene trattato con prednisone.

Ad un mese dalla diagnosi di sarcoma istiocitario, a causa di un peggioramento delle condizioni generali, l'animale viene sottoposto ad eutanasia.

Figura 30: Preparato citologico del versamento colorato con May Grünwald–Giemsa (Ob. 40x).

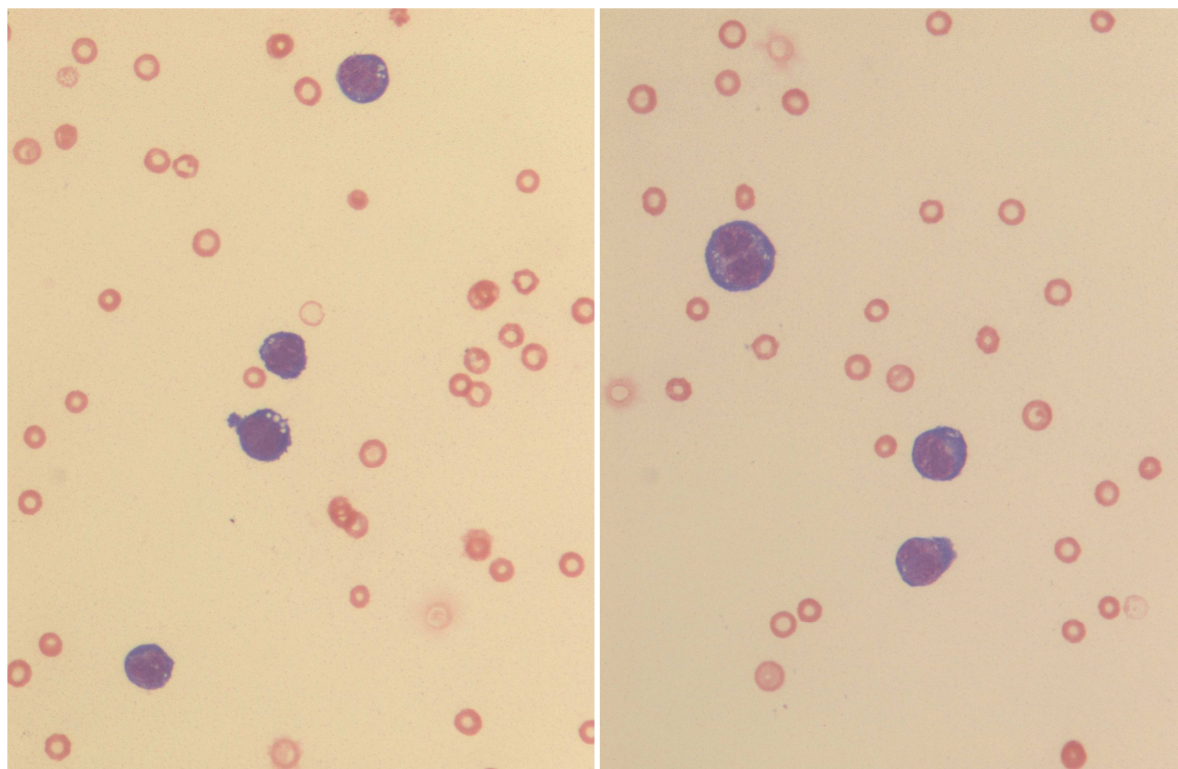


Figura 31: Assenza di positività nelle cellule del preparato per gli anticorpi specifici per i markers linfocitari CD3 e CD79 α (Ob. 40x).

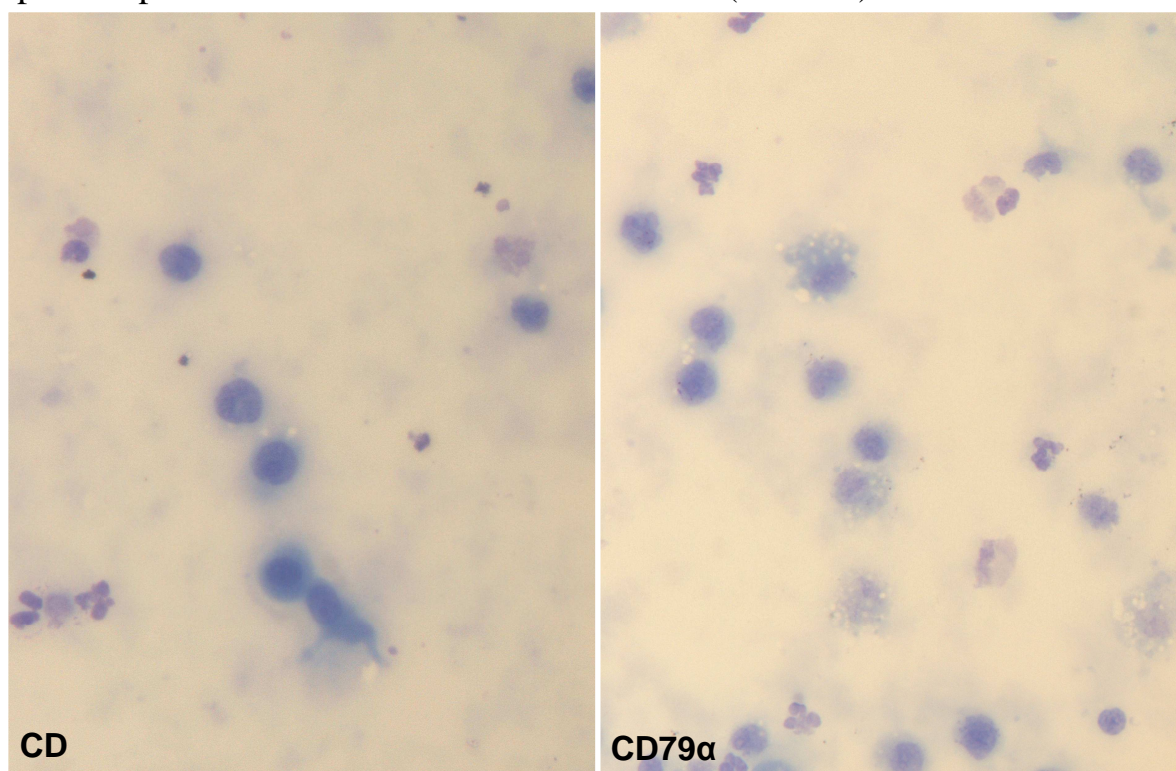


Figura 32: Assenza di positività nelle cellule del preparato per gli anticorpi specifici per i markers CD117 e mesotelina (MES) (Ob. 40x).

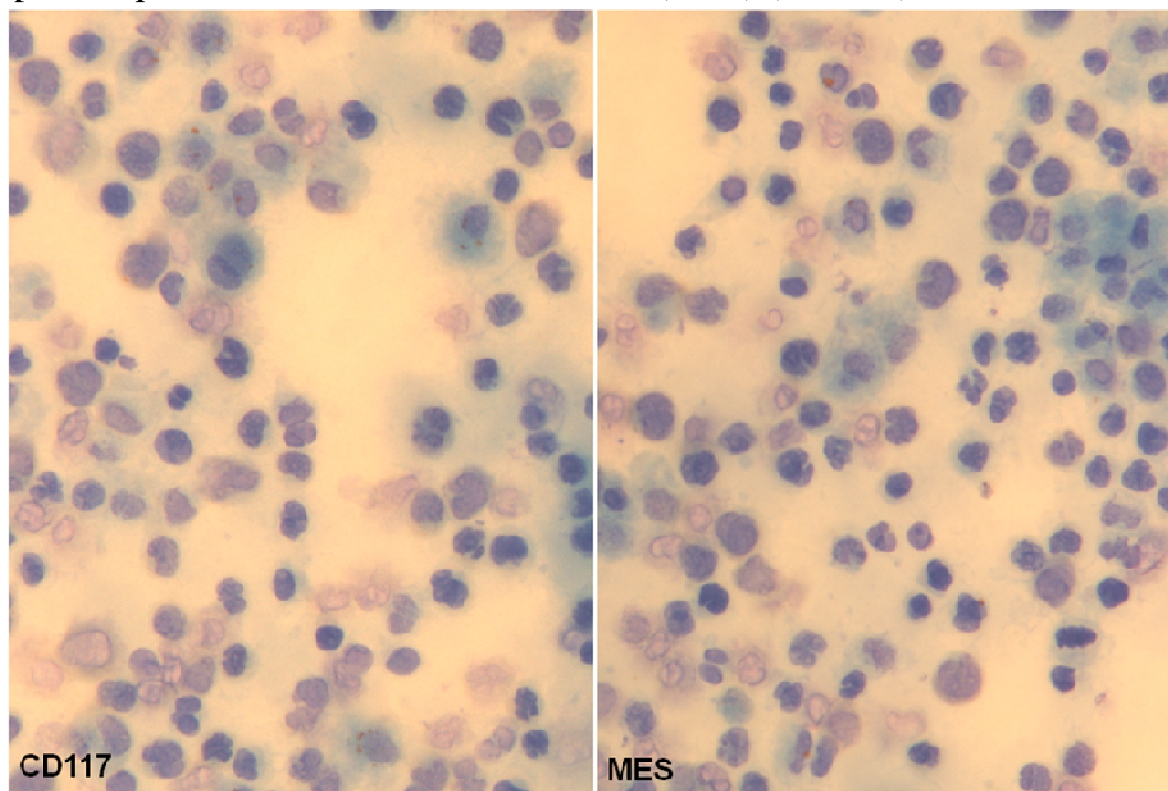


Figura 33: Assenza di positività nelle cellule del preparato per l'anticorpo specifico per la pancitocheratina (PanCK) e presenza di una forte positività citoplasmatica per il marker vimentina (VIM) (Ob. 40x).

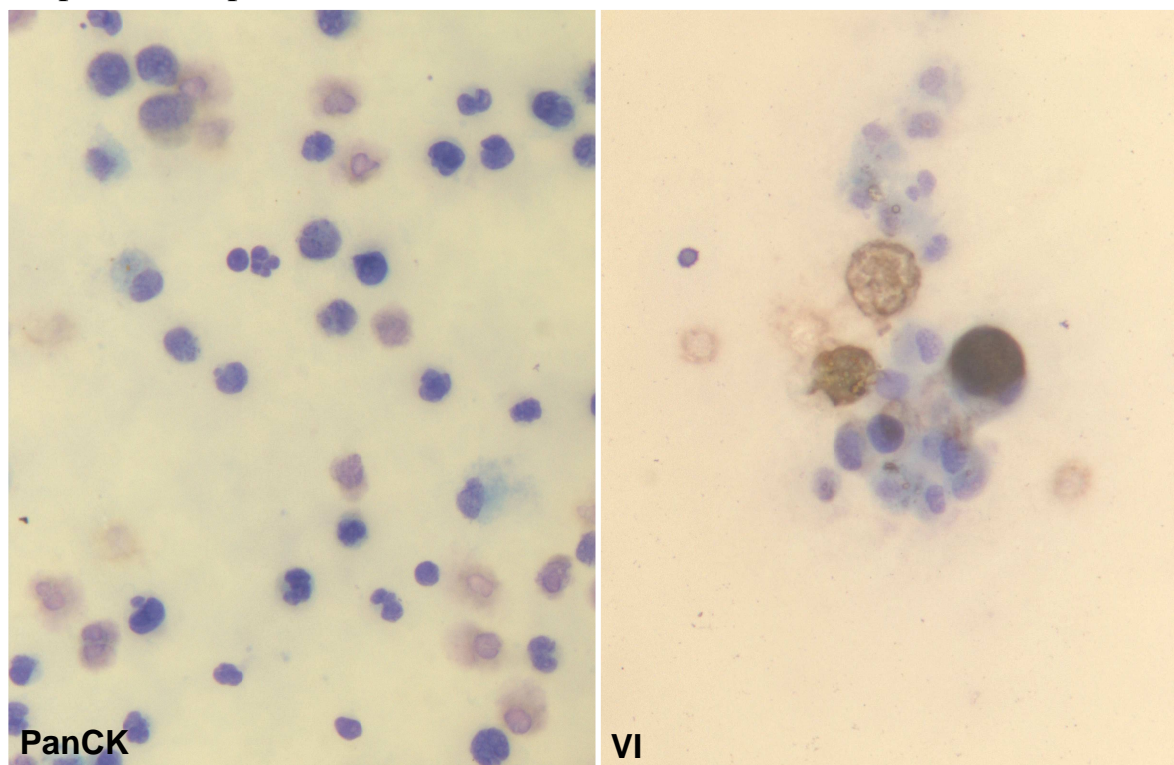
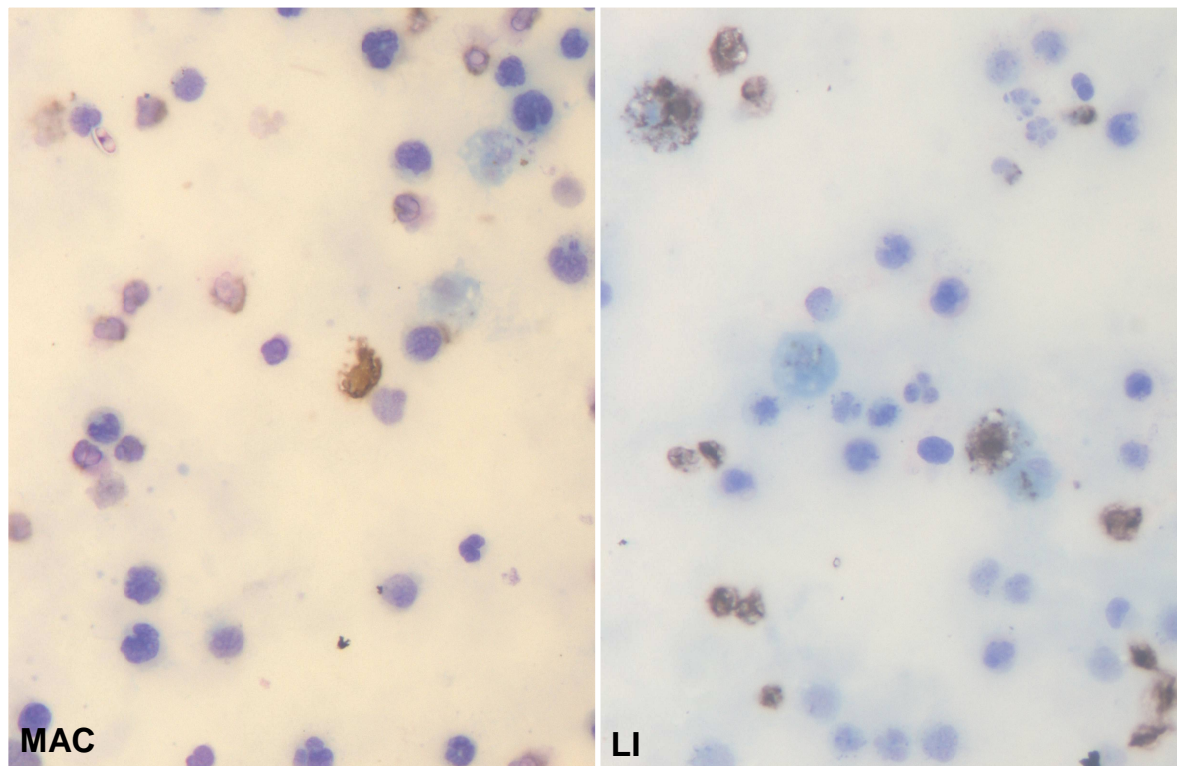


Figura 34: Presenza di una forte positività citoplasmatica nelle cellule del preparato per i markers antigene mielo-istiocitario comune (MAC) e lisozima (LIS) (Ob. 40x).



Discussione

Il sarcoma istiocitario è un tumore che origina dalle cellule appartenenti al gruppo degli istiociti, quali i macrofagi alveolari e peritoneali, le cellule di Kupffer epatiche, le cellule di Langerhans intraepiteliali, i macrofagi splenici, linfonodali e midollari (Affloter, 1997).

Le razze canine considerate a rischio sono i bovani del bernese, in particolare i maschi adulti, i pastori cernesi, i rottweiler, i golden retriever, i labrador retriever ed i dobermann (Ghisleni et al, 2006). La forma multicentrica pare essere trasmessa di generazione in generazione, con un modello poligenico di ereditarietà. Citologicamente presenta cellule di grandi dimensioni con un rapporto nucleo/citoplasma da basso a medio e un livello moderato di anisocitosi ed anisocariosi. I margini citoplasmatici sono ben definiti e la morfologia cellulare può variare da stellata a fusiforme a tondeggianti. Il citoplasma si presenta debolmente basofilo, con una quantità variabile di piccole vacuolizzazioni e

contenente pigmenti di emosiderina con tracce di eritrofagocitosi; occasionalmente si possono riscontrare anche cellule giganti multinucleate. I nuclei hanno forma variabile, tondeggianti, ovalare o reniforme e mostrano una cromatina ipercromatica di aspetto grossolano e puntiforme, con molti nucleoli prominenti e ben evidenti (Valli, 2007).

Dal punto di vista morfologico, immunofenotipico ed istologico, non esistono differenze tra forma diffusa e localizzata e non è ancora chiaro se l'istiocitosi maligna origini come disordine primitivo multicentrico, oppure rappresenti lo stadio terminale della forma localizzata viscerale che ha metastatizzato (Marconato e Del Piero, 2005).

Vista la morfologia il sarcoma istiocitario presentato in questo lavoro doveva essere messo in diagnosi differenziale dal linfoma e dal mastocitoma anaplastico. A causa della sede di sviluppo dovevano comunque essere inseriti nella diagnosi differenziale il mesotelioma ed il carcinoma.

I pannello anticorpale utilizzato è stato quindi studiato in modo da coprire tutte le ipotesi sopracitate.

Gli antigeni CD3 e CD79 α sono propri dei linfociti (rispettivamente T e B), per cui una positività monotematica ad uno dei due da parte delle cellule indagate avrebbe permesso di diagnosticare e tipizzare l'eventuale linfoma. Il recettore transmembranario CD117 (o KIT) è un antigene presente sulla membrana, e spesso anche nel citoplasma, dei mastociti neoplastici: una positività delle cellule a tale antigene avrebbe quindi permesso di identificare l'eventuale mastocitoma, fornendo al contempo il KIT pattern della neoplasia, dato utilissimo a fini prognostici e terapeutici. L'antigene comune mielo-istiocitario MAC ed il lisozima sono due epitopi presenti in tutte le cellule appartenenti al gruppo degli istiociti e nei granulociti, quindi la loro positività ha permesso di restringere l'origine delle cellule tumorali ad una di queste due linee. La mesotelina è un antigene espresso dalle cellule mesoteliali e la sua positività riscontrata nelle cellule neoplastiche avrebbe suggerito l'implicazione, da parte di questa componente, come causa del versamento. La pancitocheratina rappresenta un insieme di antigeni comuni alle cellule epiteliali, ma anche mesoteliali e la vimentina è un marker proprio sia delle cellule mesenchimali sia dei macrofagi. La sua positività, rilevata nelle cellule degli strisci, combinata con la positività al MAC, ha permesso di attestare l'origine istiocitaria della neoplasia.

Tabella 16: Riassunto delle positività delle neoplasie in diagnosi differenziale ai markers indagati

	CD3 o CD79 α	CD117	MAC	MES	LIS	PanCK	VIM
Sarcoma istiocitario	-	-	+	-	+	-	+
Linfoma	+*	-	-	-	-	-	-
Mastocitoma	-	+	-	-	-	-	-
Carcinoma	-	-	-	-	-	+	-
Mesotelioma	-	-	-	+	-	+	+

* Il linfoma risulterà positivo solo ad uno dei due anticorpi, rispettivamente al CD3 se originario dalla linea T o al CD79 α se originario dalla linea B.

Conclusioni

E' stato descritto un caso di ascite e versamento pericardico causati da un sarcoma istiocitario in una femmina di Labrador retriever adulta. La centesi effettuata su tali versamenti aveva condotto ad una diagnosi di sospetta neoplasia a cellule rotonde in una sede dove metastasi di carcinoma e mesoteliomi non sono infrequenti. L'indagine immunocitochimica delle cellule presenti all'interno del liquido è risultata di grande aiuto al fine di tipizzare correttamente il tumore, per cui è consigliabile applicare questo tipo di indagine a tutti i tipi di versamenti cavitari nei quali la citologia non riesca a spingersi oltre alla diagnosi differenziale. Nei casi di versamento inoltre, l'istologia risulta spesso non applicabile, per cui l'immunocitochimica può ritrovarsi a ricoprire un ruolo fondamentale nell'aiutare il patologo a raggiungere la diagnosi.

BIBLIOGRAFIA

Affloter V.K. and Moore P.F. (1997): Histiocytosis. In Proceedings of the 14th Annual Congress ESVD-ECVD, Pisa.

Ghisleni G. (2006): Atlante di citologia diagnostica del cane e del gatto. Le Point Veterinaire, Milano.

Marcato PS (2002): Patologia sistematica veterinaria. Esculapio, Bologna.

Marconato L., Del Piero F. (2005): Oncologia medica dei piccoli animali. Poletto editore, Gaggiano (Milano).

Valli V.E. (2007): Veterinary Comparative Hemathopathology. Blackwell Publishing Professional, Iowa.

4.4 Linfoma spinale

Riassunto

Viene riportato il caso di un gatto comune europeo maschio castrato di 7 anni affetto da una paraparesi causata da un linfoma spinale di tipo B. La diagnosi di linfoma e la sua tipizzazione sono state raggiunte rapidamente grazie all'ausilio dell'indagine citologica ed immunocitochimica.

Gli anticorpi testati sono stati quelli per la rivelazione del CD3 e del CD79 α .

Introduzione

Il linfoma regionale con sede primitiva nel sistema nervoso centrale è una neoplasia abbastanza infrequente sia nell'uomo che negli animali (Koestner et al., 1990, 2002; Summers et al., 1995;

Maxie et al, 2007). La maggior parte di questi linfomi, nell'uomo, è di tipo B a grandi cellule e i casi riportati come T sono delle vere e proprie eccezioni (Kleihues et al., 2000). Nel gatto i linfomi regionali che si sviluppano nel sistema nervoso centrale sono rari e, per la maggior parte, di derivazione dalla linea T (Koestner et al., 1990, 2002; Fondevila et al., 1998). Quasi tutti i linfomi felini riportati in letteratura sono stati descritti come infiltrazioni neoplastiche delle meningi e degli spazi perivascolari o come masse solitarie (Morita et al., 2009). Lo scopo di questo lavoro è mostrare come l'indagine immunocitochimica abbia contribuito in maniera rapida ed efficace alla diagnosi di questa particolare patologia.

Caso clinico

Un gatto comune europeo maschio castrato di 7 anni viene condotto alla visita veterinaria a causa del trascinarsi degli arti posteriori, esordito come paresi di un singolo arto ed estesosi, nel giro di poco tempo, anche all'arto controlaterale. Entrambi i posteriori sono portati in iperestensione. Viene intrapresa la

somministrazione di prednisone che porta notevoli miglioramenti, ma una volta sospesa la terapia compare un peggioramento della sintomatologia. Viene quindi ripresa la terapia cortisonica fino alla risoluzione della stessa.

Un mese dopo il termine del secondo ciclo di cortisonici e due mesi dopo la prima visita, l'animale viene portato all'Ospedale didattico della Facoltà di medicina veterinaria di Bologna ad Ozzano dell'Emilia per una visita neurologica a causa della ricomparsa della paraparesi. L'animale mostra di provare dolore qualora sollevato. Viene eseguito un esame radiografico della colonna vertebrale che evidenzia un quadro radiografico del tratto toraco-lombare ai limiti della normalità. Sette giorni dopo si procede all'intervento chirurgico teso ad indagare e risolvere la causa dell'anomalia radiografica e della paraparesi. Il chirurgo riporta la presenza di una neoformazione vermiforme estesa da T12 a L2, vascolarizzata e in rapporto con il plesso venoso. Dopo l'asportazione della massa il midollo riacquista la sua sede fisiologica. Il materiale prelevato viene inviato al laboratorio dove viene effettuata un'indagine citologica ed immunocitochimica al fine di tipizzare la neoplasia. La citologia riferisce, alla prima lettura, un forte sospetto di linfoma e così il pannello anticorpale viene improntato in modo da poter testare questa diagnosi. Vengono dunque testati gli antigeni linfocitari CD3 e CD79 α dei quali solo l'ultimo risulta positivo, conducendo alla diagnosi definitiva di linfoma a cellule B.

Il gatto viene trattato con cloranbucile e prednisone, terapia che lo porta alla completa remissione dei sintomi in 3 mesi. Dopo un periodo esente da malattia di un mese la sintomatologia neurologica si ripropone e viene aumentato il dosaggio dei farmaci. L'animale viene soppresso 4 mesi dopo, a causa di un progressivo peggioramento delle condizioni di salute generali.

Figura 35: Preparato citologico (striscio da ago aspirato) colorato con May Grünwald–Giemsa

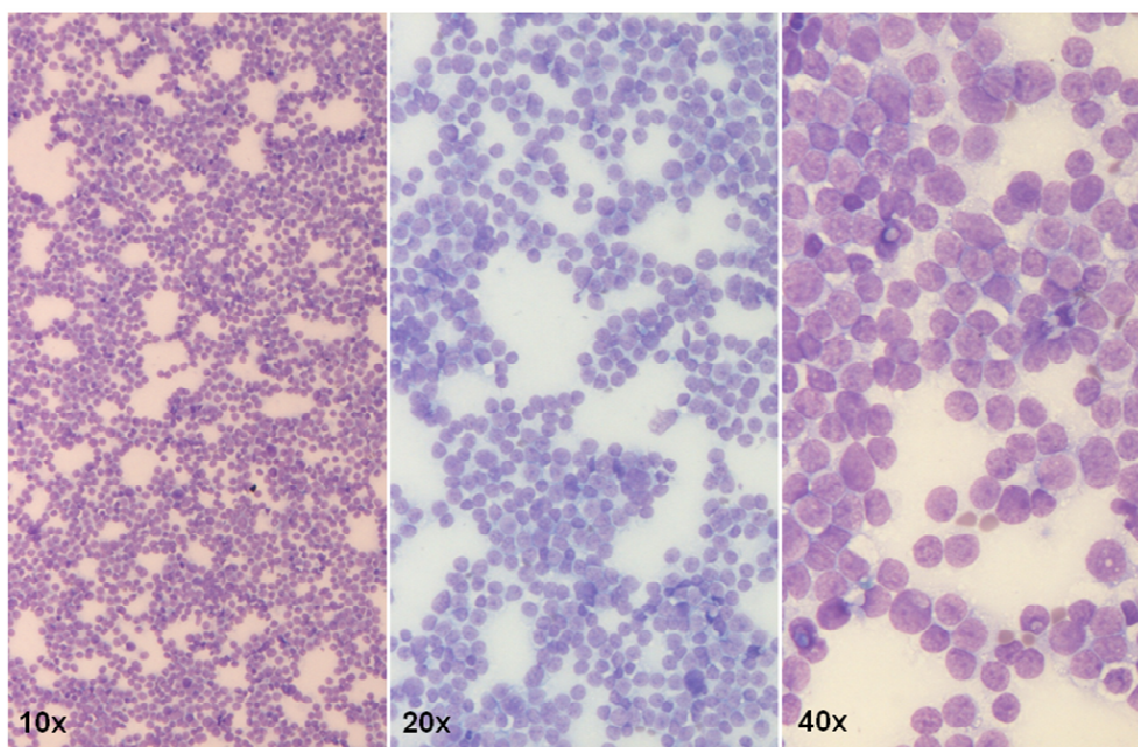
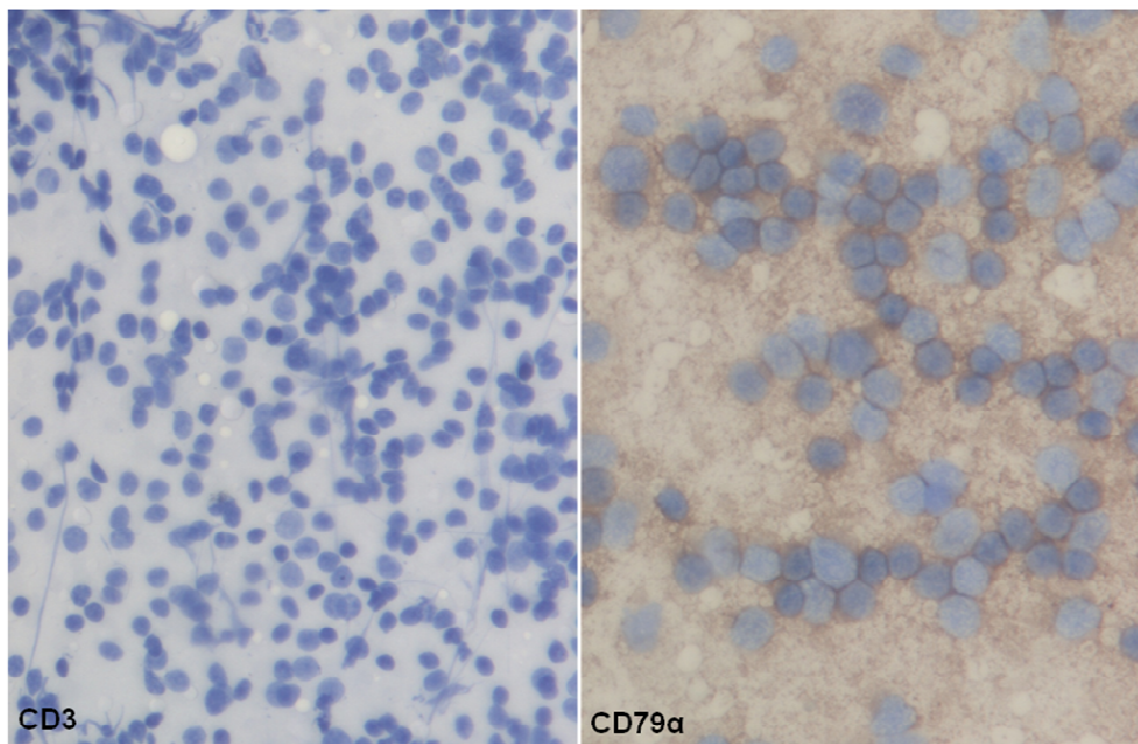


Figura 36: Reattività delle cellule del preparato a gli anticorpi specifici per i markers linfocitari CD3 e CD79 α (Ob. 40x). Assenza di positività nel preparato testato per il CD3 e presenza di una positività citoplasmatica nei linfociti testati per il CD79 α



Discussione

Il linfoma rappresenta nel gatto la seconda neoplasia più frequente del sistema nervoso centrale e la prima in sede spinale (Spodnick et al., 1992). Nei gatti affetti da linfoma, il coinvolgimento del sistema nervoso centrale viene riscontrato nel 12-23% dei casi (Lane et al., 1994; Louwerens et al., 2005).

In 2 articoli il linfoma spinale viene presentato come extradurale rispettivamente nell'82% e nel 69% dei casi, e la sintomatologia neurologica è causata dalla compressione esercitata sul midollo dalla crescita della massa (Lane et al., 1994; Zaki et al., 1976). Tuttavia uno studio più recente riporta questo tipo di lesione come intradurale nel 70% dei casi (Marioni-Henry et al., 2004). La maggior parte degli animali viene presentata alla visita per la comparsa di una paresi progressiva, ma la sintomatologia neurologica evocata dal tumore può variare a seconda della sede di insorgenza (Flatland et al., 2008). Comunque la paraparesi o la paraplegia sono i riscontri più comuni in quanto il linfoma spinale tende a colpire più frequentemente i tratti toraco-lombari (Flatland et al., 2008; Lane et al., 1994; Marioni-Henry et al., 2004; Northington et al., 1978).

Come nel caso descritto, il dolore a livello di colonna vertebrale può precedere o accompagnare la paresi o la paralisi (Northington et al., 1978). La progressione della sintomatologia clinica è generalmente rapida, sviluppandosi in un periodo compreso tra le 1 e 4 settimane (Lane et al., 1994; Noonan et al., 1997; Northington et al., 1978; Schappert et al., 1967; Spodnick et al., 1992). Il soggetto presentato in questo caso è al di fuori della fascia di età riportata nella letteratura, in quanto il 60% dei casi di linfoma spinale felino colpiscono animali di 5 anni o meno (Flatland et al., 2008; Lane et al., 1994; Noonan et al., 1997; Northington et al., 1978; Schappert et al., 1967; Spodnick et al., 1992). Non sembrano esistere predisposizioni di razza per questa patologia, tuttavia è stata riscontrata una maggiore incidenza, pari al 67%, nei maschi (Spodnick et al., 1992).

Questa patologia, di solito, colpisce contemporaneamente più tratti vertebrali (Lane et al., 1994; Marioni-Henry et al., 2004; Spodnick et al., 1992).

Gli antigeni da noi indagati, il CD3 ed il CD79 α , sono propri dei linfociti (il primo dei T, il secondo dei B), per cui la positività monotematica del secondo da parte delle cellule indagate ha permesso di confermare la diagnosi e tipizzare il linfoma spinale come a cellule B.

Conclusioni

In questo esempio viene descritto un caso di paraparesi in un gatto causata da un linfoma spinale a cellule B insorto nel segmento toraco-lombare T12-L2. Nonostante la sintomatologia fosse genericamente indicativa di tale tipo di patologia, la diagnosi certa è stata raggiunta solo mediante l'ausilio della metodica citologica ed immunocitochimica. In questo caso, l'applicazione delle metodiche immunologiche ai preparati citologici ha fornito rapidamente una conferma al sospetto citologico, permettendo di approntare quanto prima la terapia più adeguata del caso.

L'indagine immunocitochimica rappresenta quindi un metodo pratico ed accurato per la diagnosi e la fenotipizzazione del linfoma (Caniatti et al., 1996).

In questo esempio si sottolinea come ricorrere a tale metodica nell'ambito di determinate patologie consenta di ricorrere ad interventi mirati e tempestivi.

BIBLIOGRAFIA

Caniatti M., Roccabianca P., Scanziani E., Paltrinieri S. and Moore P.F. (1996): Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol.* 33:204-212.

Flatland B., Fry M.M., Newman S.J., Moore P.F., Smith J.R., Thomas W.B. and Casimir R.H. (2008): Large anaplastic spinal B-cell lymphoma in a cat. *Vet Clin Pathol.* 37:389-96.

Fondevila D., Vilafranca M. and Pumarola M. (1998): Primary central nervous system T-cell lymphoma in a cat. *Vet Path* 35:550-553.

Kleihues P. and Cavenee W. K. (2000): Tumors of the haemopoietic system. In: *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System*. P. Kleihues and W. K. Cavenee Eds. IARC Press, Lyon, pag197-206

Koestner A., Bilzer T., Fatzer R., Schulman F. Y., Summers B. A. and Van Winkle T. J. (1990): Lymphomas and hematopoietic tumors. In: *Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals*, (2nd Series), Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., pag30-32.

Koestner A. and Higgins R. J. (2002): Tumors of the nervous system. In: Tumors in Domestic Animals, 4th Edit., D. J. Meuten, Ed., Iowa State University Press, Ames, pag 697-738.

Lane S.B., Kornegay J.N., Duncan J.R. and Oliver J.E. Jr. (1994): Feline spinal lymphosarcoma: a retrospective evaluation of 23 cats. J Vet Intern Med 8:99–104.

Louwerens M., London C.A., Pedersen N.C. and Lyons L.A. (2005): Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. J Vet Intern Med 19:329–335.

Marioni-Henry K., Vite C.H., Newton A.L. and VanWinkle T.J. (2004): Prevalence of diseases of the spinal cord of cats. J Vet Intern Med 18:851–858.

Maxie M. G. and Youssef S. (2007): Nervous system. In: Pathology of Domestic Animals, 5th Edit., Vol. 1, M. G. Maxie, Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, pag281-457.

Morita T., Kondo H., Okamoto M., Park C. H., Sawashima Y. and Shimada A. (2009): Periventricular Spread of Primary Central Nervous System T-cell Lymphoma in a Cat. J. Comp. Path 140, 54-58.

Noonan M., Kline L.K. and Meleo K. (1997): Lymphoma of the central nervous system: a retrospective study of 18 cats. Comp Cont Ed Pract Vet 19:497–503.

Northington J.W. and Juliana M.M. (1978): Extradural lymphosarcoma in six cats. J Small Anim Pract 19:409–416.

Schappert H.R. and Geib L.W. (1967): Reticuloendothelial neoplasms involving the spinal canal of cats. J Am Vet Med Assoc 150:753–757.

Spodnick G.J., Berg J., Moore F.M. and Cotter S.M. (1992): Spinal lymphoma in cats: 21 cases (1976–1989). J Am Vet Med Assoc 200:373–376.

Summers B. A., Cummings J. F. and de Lahunta A.(1995). Tumors of the central nervous system. In: Veterinary Neuropathology, B. A. Summers, J. F. Cummings and A. de Lahunta, Eds, Mosby, St Louis, pag351-401.

Zaki F.A. and Hurvitz A.I. (1976): Spontaneous neoplasms of the central nervous system of the cat. J Small Anim Pract 17:773–782.

5. VALUTAZIONE DEL RECETTORE KIT (CD117) NEI MASTOCITOMI CUTANEI DEL CANE E DEL GATTO

5.1 Introduzione

Il mastocitoma cutaneo è una delle neoplasie più frequenti nel cane e rappresenta dall'11 al 27% di tutti i tumori cutanei maligni di questa specie (Goldshmidt et al., 2002; Thamm et al., 2007). Anche nel gatto questa patologia risulta essere piuttosto frequente, rappresentando dall'8 al 15% dei tumori cutanei totali in questo animale (Lee et al., 2005).

Sono stati studiati vari fattori prognostici al fine di predire il comportamento biologico dei mastocitomi: lo staging clinico (Kiupel et al., 2005; Moore et al., 2006; Mullins et al., 2006; Thamm et al., 2007), la localizzazione anatomica (Gieger et al., 2003; Sfiligoi et al., 2005; Turrel et al., 1988), l'attività proliferativa (Abadie et al., 1999; Romansik et al., 2007; Simoes et al., 1994), l'anaploidia (Ayl et al., 1992), le regioni di organizzazione nucleolari tramite la tecnica dell'AgNOR (Bostock et al., 1989; Kravis et al., 1996; Simoes et al., 1994) e il grado istologico proposto da Patnaik (Patnaik et al., 1984; Simoes et al., 1994). Quest'ultimo, nonostante sia stato il primo ad essere applicato, rimane tutt'ora il parametro predittivo più efficace. Il punto fondamentale del sistema di grading istologico è la valutazione della morfologia nucleare e del grado di differenziazione dei mastociti, inoltre viene valutato il tipo di infiltrazione sviluppato dalla neoplasia ed il numero di mitosi.

Negli ultimi anni si è cercato di affiancare a questi strumenti dei nuovi parametri basati sulla valutazione dell'espressione di determinate molecole da parte delle cellule neoplastiche. Il proto-oncogene c-kit codifica per il recettore KIT (CD117), un recettore di tipo 3 ad attività tirosin-chinasica costituito da una porzione extracellulare specifica per il ligando SCF (Stem Cell Factor), un dominio transmembranario, un tratto juxtamembranario ad attività regolatoria inibente ed una ultima parte ad attività tirosin-chinasica (Miettinen et al., 2005). Nell'uomo e nei cani sani, questo recettore è espresso da svariati tipi cellulari, tra cui i mastociti, le cellule germinali, i melanociti, le cellule interstiziali di Cajal e dalle cellule ad attività emopoietica (Miettinen et al., 2005; Morini et al., 2004). Nei mastociti, il KIT ed il suo ligando, lo Stem Cell Factor, sono implicati nella regolazione della

sopravvivenza cellulare, della replicazione, della differenziazione, della chemiotassi, della degranolazione e dell'adesione alla fibronectina (Serve et al., 1995; Timokhina et al., 1998; Vosseller et al., 1997; Yee et al., 1994). Inoltre il c-kit è stato correlato alla patogenesi del mastocitoma cutaneo canino (Webster et al., 2006). Sono state identificate mutazioni (internal tandem duplication, delezioni e mutazioni puntiformi) a carico del dominio juxtamembranario (esone 11) del c-kit nel 15-50% dei casi di mastocitoma cutaneo canino. Queste mutazioni sono state considerate le responsabili della fosforilazione ligando-indipendente del KIT e della conseguente replicazione autonoma dei mastociti neoplastici (Downing et al., 2002; London et al., 1999; Ma et al., 1999; Riva et al., 2005; Webster et al., 2006; Webster et al., 2007; Zemke et al., 2002). Recenti lavori hanno dimostrato che le mutazioni del c-kit sono significativamente associate ad un alto grado istologico ed ad una prognosi infausta (Webster et al., 2007; Zemke et al., 2002).

L'immunoistochimica ha evidenziato che il KIT, in molti mastocitomi, ha la tendenza a venir accumulato in localizzazioni aberranti: mentre i mastociti normali presentano una colorazione relegata a livello di membrana, mostrando la fisiologica localizzazione transmembranaria del KIT, frequentemente i mastociti neoplastici esibiscono una colorazione citoplasmatica granuleggiante o diffusa (London et al., 1996; Morini et al., 2004; Preziosi et al., 2004; Webster et al., 2004). I mastocitomi cutanei del cane che presentano una positività citoplasmatica al il KIT sono dotati di una maggiore attività proliferativa e di una prognosi decisamente peggiore rispetto a quelli che presentano la sola positività di membrana (Gil da Costa et al., 2007; Preziosi et al., 2004; Webster et al., 2007). Inoltre, le mutazioni di tipo internal tandem duplication, sono significativamente associate alla delocalizzazione del KIT nei mastociti neoplastici (Webster et al., 2007).

La citologia agoaspirativa è ad oggi uno degli strumenti più rapidi ed efficaci per la diagnosi di mastocitoma cutaneo in quanto gli strisci allestiti generalmente mostrano delle caratteristiche citomorfologiche che, qualora riconosciute, conducono alla diagnosi definitiva (Moore et al., 2006; Thamm et al., 2007). Tuttavia, quando i mastocitomi sono poco differenziati, i criteri morfologici possono non essere sufficienti per raggiungere la diagnosi. Le colorazioni metacromatiche (es: Blu di toluidina) possono fornire elementi addizionali per confermare la diagnosi di mastocitoma, ma quando la neoplasia raggiunge livelli di perdita della differenziazione estremi le cellule possono essere completamente

sprovviste di granuli e quindi non presentare la metacromasia, rendendo difficoltosa la diagnosi. Numerosi lavori indicano che il KIT è un marker affidabile per la diagnosi di mastocitoma cutaneo in quanto il suo grado di espressione appare correlato, in maniera inversa, al grado di differenziazione di questo tumore (Gil da Costa et al., 2007; Kiupel et al., 2004; Preziosi et al., 2004; Reguera et al., 2000). Fino ad ora la valutazione dell'espressione del KIT in preparati citologici è stata effettuata solo su materiale prelevato da colture cellulari di mastocitoma cutaneo canino (Gleixner et al., 2007; Reguera et al., 2000), mai da casi clinici. Oltre ad aiutare a raggiungere la diagnosi, la conoscenza del tipo di espressione del KIT aiuta a formulare la prognosi ed a fornire la terapia adeguata, soprattutto per quanto riguarda animali in cui la chirurgia non sia possibile o abbia esitato in una recidiva locale con o senza metastasi. Recentemente infatti sono stati sviluppati dei potenti inibitori delle tirosinchinasi, tra i quali i più documentati nella pratica veterinaria sono stati l'Imatinib (Isotani et al., 2006, 2008; Lachowicz et al., 2005; Marconato et al., 2008) ed il Masatinib (Hahn et al., 2008) che risultano essere maggiormente efficaci su quelle masse che presentano la delocalizzazione del segnale.

La citologia possiede l'indubbio vantaggio di permettere il raggiungimento della diagnosi molto più rapidamente rispetto alla biopsia, fornendo elementi utili per la terapia, farmacologica o chirurgica che sia. Implementando quest'ultima con l'immunocitochimica si è ottenuto un valido strumento prognostico e terapeutico.

5.2 Materiali e Metodi

Lo studio ha riguardato 49 casi di MCT canino e felino diagnosticati citologicamente e in seguito rimossi chirurgicamente raccolti in un periodo di 3 anni (gennaio 2006 – dicembre 2008). In 27 casi erano disponibili sia campioni citologici sia istologici della lesione.

Citologia. I campioni citologici sono stati ottenuti per agoaspirazione, strisciati su un vetro portaoggetti e lasciati asciugare all'aria; gli strisci per la valutazione citomorfologica sono stati colorati con May-Grünwald – Giemsa. mentre quelli destinati all'immunocitochimica sono stati processati come descritto di seguito.

Immunocitochimica. I preparati destinati all' immunocitochimica sono stati fissati per 10 minuti in acetone raffreddato a 4°C. Gli strisci non sottoposti immediatamente all'indagine immunocitochimica sono stati conservati a 4°C per un periodo variabile da pochi giorni a 8 mesi. I campioni fissati in acetone sono stati sottoposti ad inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 10 minuti), reidratazione (tampone TRIS per 10 minuti) ed incubazione in camera umida con anticorpo policlonale di coniglio anti-CD117 umano (Dako; Dakopatts, Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS e 1% di BSA overnight a 4°C. Si è proceduto poi con lavaggio (TRIS per 2 minuti), incubazione con l'anticorpo secondario (IgG anti-rabbit biotinilato per 15 minuti), ulteriore lavaggio in TRIS per 2 minuti, incubazione in streptoavidina-perossidasi (15 minuti), lavaggio in TRIS per 2 minuti e rivelazione in diaminobenzidina 0,04% per 10 minuti. Dopo ulteriori lavaggi in TRIS (2 minuti) e in acqua distillata (2 minuti) è stata applicata la colorazione di contrasto con May-Grünwald – Giemsa modificato (soluzione May-Grünwald 1 minuto e 2 secondi, lavaggio in acqua distillata 1 minuto, soluzione Giemsa diluita 1 goccia/cc per 5 minuti). I preparati sono stati montati con DPX.

Istologia. Laddove erano presenti campioni per l'istologia, derivanti dalla rimozione chirurgica del MCT o da biopsie delle masse, questi sono stati fissati in formalina al 10% tamponata a pH 7,2, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina eosina e blu di toluidina. Il grado istologico è stato determinato, nei mastocitomi cutanei, secondo il metodo suggerito da Patnaik (Patnaik et al., 1984).

Immunoistochimica. Ulteriori sezioni istologiche sono state deparaffinate (2 bagni in Solvent Plus per 15 minuti) e reidratate in alcoli a concentrazione decrescente (3 minuti ogni bagno). Si è proceduti all' inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 30 minuti), alla riesposizione antigenica (2 cicli di 5 minuti in forno a microonde a 750 Watt in tampone citrato pH 6 e raffreddamento a temperatura ambiente per 20 minuti), all'incubazione in camera umida con anticorpo policlonale di coniglio anti-CD117 umano (Dako; Dakopatts, Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS e 1% di BSA overnight a 4°C. Dopo due lavaggi (TRIS per 5 minuti) è stata eseguita l'incubazione con anticorpo secondario (IgG anti-rabbit biotinilato per 15 minuti); seguivano due lavaggi

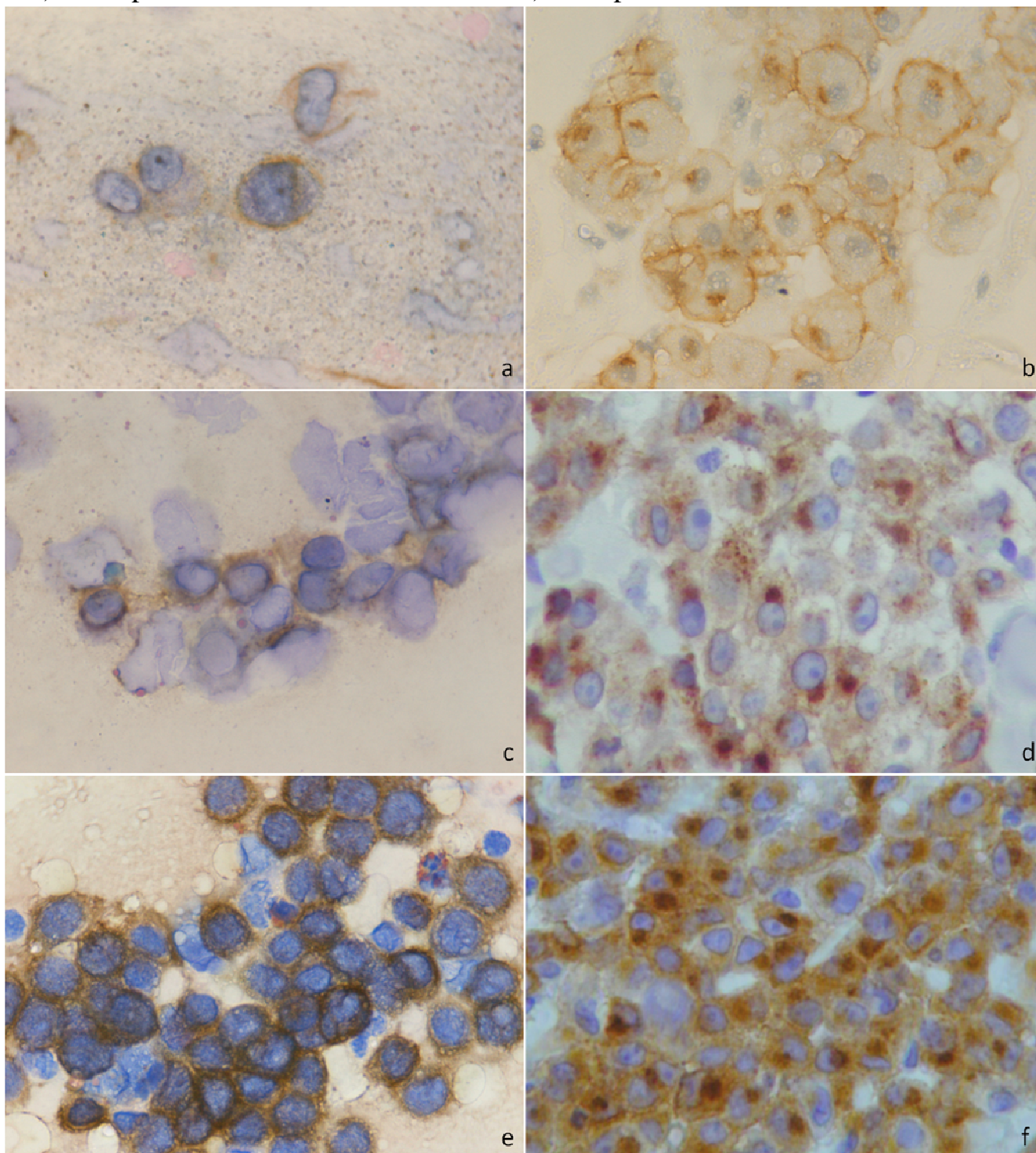
(TRIS per 5 minuti), l'incubazione con il complesso streptoavidina-perossidasi (15 minuti), due lavaggi (TRIS per 5 minuti) e la rivelazione in diaminobenzidina 0,04% per 10 minuti. Dopo un ultimo lavaggio in TRIS (5 minuti) ed uno in acqua distillata (5 minuti) i preparati sono stati contrastati con ematossilina di Papanicolau e montati in DPX.

Valutazione della immunopositività. Nei preparati citologici e istologici la positività alla immunocolorazione per CD117 è stata valutata secondo i canoni proposti da Kiupel (Kiupel et al., 2004) e Webster (Webster et al. 2006). Nello specifico questi autori individuano 3 diversi pattern di colorazione delle cellule tumorali: il primo (KIT pattern I) caratterizzato da una positività immunologica al recettore KIT localizzata esclusivamente a livello di membrana, il secondo (KIT pattern II) rappresentato da una positività al CD117 presente a livello citoplasmatico con una disposizione granuleggiante o come singolo “dot” in posizione paranucleare ed il terzo (KIT pattern III) identificabile per la positività diffusa a tutto il citoplasma (Figura 37).

Analisi statistica. La concordanza tra l'immunocitochimica e l'immunoistochimica nel dimostrare l'espressione del KIT pattern è stata quantificata con il test del Kappa Pesato di Cohen. La concordanza è stata calcolata considerando il KIT pattern I, II e III come categorie separate. La concordanza è stata considerata ottima per k compreso tra 0,81 e 1,00, buona per k compreso tra 0,61 e 0,80, moderata per k compreso tra 0,41 e 0,60 e scarsa per k al di sotto di 0,40. E' stato utilizzato il coefficiente di correlazione Spearman per studiare la relazione tra la differenziazione citologica ed il grado istologico. L'analisi statistica è stata effettuata con GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La significatività è stata fissata a $P < 0.05$.

Figura 37: Kit pattern in immunocitochimica ed immunoistochimica (Ob. 100x):

- a) KIT pattern 1 in immunocitochimica b) KIT pattern 1 in immunoistochimica
c) KIT pattern 2 in immunocitochimica d) KIT pattern 2 in immunoistochimica
e) KIT pattern 3 in immunocitochimica f) KIT pattern 3 in immunoistochimica



5.3 Risultati

Pazienti. Dei 49 mastocitomi indagati tramite la metodica immunocitochimica, 46 erano di cane e 3 erano di gatto.

L'età dei cani affetti da questo tumore variava dai 4 ai 15 anni, con una mediana di 9 anni, quella dei gatti variava dagli 8 ai 10 anni, con una mediana di 9 anni. L'età di 2 cani e di 1 gatto era sconosciuta.

Ventidue cani erano maschi (47,82%), di cui 6 castrati (27,27%) e 22 erano femmine (47,82%), di cui 11 sterilizzate (50%). I gatti erano rispettivamente 2 maschi (66,66%) ed una femmina (33,33%). In 2 cani il sesso non era stato riportato.

Ventuno dei 46 cani affetti da mastocitoma erano meticci (45,66%), 9 boxer (19,57%), 3 labrador retriever (6,5%), 2 breton (4,36%), 2 pechinesi (4,36%), 2 sharpei (4,36%), 1 beagle (2,17%), 1 carlino (2,17%), 1 golden retriever (2,17%), 1 maltese (2,17%), 1 setter inglese (2,17%), 1 siberian husky (2,17%) ed 1 yorkshire terrier (2,17%). Tutti e 3 i gatti erano dei comuni europei.

Le masse neoplastiche erano localizzate in 20 cani su un arto (43,48%), in 5 su un orecchio (10,87%), in 4 nella regione mammaria (8,70%), in 4 nella regione perineale (8,70%), in 3 sul fianco (6,52%), in 2 sul collo (4,35%), in 1 sulla coda (2,17%), in 1 a livello di laringe (2,17%), in 1 sul prepuzio (2,17%), in 1 sulla schiena (2,17%) ed in 1 sul viso (2,17%). In 3 casi di mastocitoma cutaneo canino (6,52%) la localizzazione della massa non era indicata. Nei tre gatti, 2 mastocitomi erano presenti a livello del viso (66,66%) ed uno era splenico (33,33%).

Istologia ed immunoistochimica. Erano presenti 27 campioni istologici delle lesioni analizzate, di cui 26 canini ed 1 felino. Basandosi sul grado istologico proposto da Patnaik (Patnaik et al., 1984), 7 mastocitomi cutanei canini sono stati classificati come grado istologico I (26,92%), 11 come grado istologico II (42,31%) e 8 come grado istologico III (30,77%). La colorazione immunoistochimica per l'evidenziazione del recettore KIT ha dimostrato un'intensa colorazione di membrana (KIT pattern I) in 6 casi (23,08%). In 8 casi (30,77%) era presente una positività di tipo granuleggiante o concentrata in un unico "dot" paranucleare a livello citoplasmatico (KIT pattern II), mentre in 12 casi (46,15%) era presente una positività intensa e diffusa a tutto il citoplasma (KIT pattern III).

Il mastocitoma cutaneo felino era di grado II e la colorazione immunoistochimica lo ha identificato come KIT pattern III.

Immunocitochimica. Per ogni caso sul quale è stata testata la reazione al recettore KIT sono stati colorati da 1 a 4 vetri. La colorazione immunocitochimica ha fornito risultati soddisfacenti in 45 casi (91,84%), 43 di cane (93,48%) e 2 di gatto (66,66%), mentre in 3 casi (6,52%) di cane e 1 di gatto (33,33%), non è stato possibile ottenere una reazione valutabile. Nel corso della nostra indagine su questi casi non è stato possibile risalire con certezza alla causa della mancata reazione della tecnica, tuttavia è stato possibile ipotizzarla per 2 preparati: uno striscio già fissato in acetone era stato contaminato con formalina, l'altro apparteneva ad un mastocitoma fortemente indifferenziato che verosimilmente avrebbe potuto non esprimere affatto il recettore.

Nove mastocitomi canini presentavano KIT pattern 1 (20,93%), 24 KIT pattern 2 (55,81%) e 10 KIT pattern 3 (23,26%). Entrambi i mastocitomi felini reattivi presentavano KIT pattern II.

Tabella 17: Pattern di espressione del recettore KIT nei preparati di cane e gatto

	Cane	Gatto
KIT pattern I	9	0
KIT pattern II	24	0
KIT pattern III	10	2
Non reattivo	3	1
TOTALE	46	3

Nei campioni citologici il numero di cellule utili per la valutazione del KIT variava a seconda della qualità degli strisci. Se le cellule erano state danneggiate da uno striscio troppo energico, i mastociti si presentavano come nuclei nudi circondati dal citoplasma sparso sul fondo del vetro. In queste cellule non è stato possibile valutare il KIT pattern. Al contrario, dove lo striscio era rimasto troppo spesso, la presenza di cluster cellulari impediva la penetrazione dell'anticorpo nelle porzioni interne dell'ammasso stesso, rendendo le cellule centrali negative. Tutti i casi in cui è stata espressa la valutazione del KIT pattern presentavano, tuttavia, almeno una zona con un numero sufficiente di cellule valutabili.

Sono stati allestiti dei controlli positivi tramite impronta da pezzi ottenuti dalla resezione chirurgica di mastocitomi canini. Tali controlli sono stati fissati in

acetone a 4°C come già descritto, ed hanno mantenuto la loro immunoreattività per 8 mesi quando conservati a 4°C, per 4 settimane quando conservati a temperatura ambiente. Sono stati effettuati vari tentativi al fine di recuperare la positività immunocitochimica in preparati già contrastati con May-Grünwald – Giemsa, ma sono stati ottenuti solo risultati parziali non soddisfacenti, in termini di qualità, al fine di valutare il KIT pattern.

Comparazione tra immunocitochimica ed immunoistochimica. Laddove era pervenuto anche il campione di tessuto per fini istologici, è stata effettuata una comparazione diretta tra la tecnica immunocitochimica e quella immunoistochimica per valutare la sovrapponibilità dei risultati ottenuti. E' stato possibile eseguire questo confronto su 27 casi, di cui 26 di cane ed 1 di gatto. In uno studio da noi realizzato proprio su questo argomento (Cesari et al., 2008) è stata analizzata la concordanza tra le due tecniche ed il test statistico del k di Cohen, applicato ad un pool di 25 mastocitomi cutanei canini, ha messo in luce che la concordanza tra immunocitochimica ed immunoistochimica, al momento di valutare il KIT pattern, è di tipo moderato ($k=0.51$, $CI=95\%: 0,18 -0,74$), tuttavia è stato possibile dimostrare come le due tecniche raggiungano una maggiore sintonia nel momento in cui debbano dimostrare solo la delocalizzazione dell'espressione del KIT ($k=0,75$: concordanza buona, $CI\ 95\%: 0,42 - 1,08$).

Tabella 18: Risultati dell'applicazione delle tecniche immunoistochimica ed immunocitochimica a 25 campioni di mastocitoma cutaneo canino per la valutazione del KIT pattern (Cesari et al., 2008)

n° caso	ImmunoIstochimica	ImmunoCitochimica
1	1	1
2	1	1
3	1	1
4	1	1
5	1	2
6	2	2
7	2	2
8	2	2
9	2	2
10	2	2
11	2	2
12	2	2
13	2	3
14	3	3
15	3	3
16	3	3
17	3	3
18	3	3
19	3	1
20	3	2
21	3	2
22	3	2
23	3	2
24	3	2
25	3	2

Comparazione tra citologia ed istologia. Nei casi in cui era presente anche il campione per l'istologia si è provveduto ad effettuare anche una comparazione tra il grado di differenziazione citologica ed il grado istologico dei mastocitomi. Si è così notata una correlazione positiva tra questi due aspetti nei mastocitomi esaminati ($r=0,62$, CI 95%: 0,28 – 0,82, $p<0,01$).

5.4 Discussione

Numerosi lavori (Gil da Costa et al., 2007; Kiupel et al., 2004; Preziosi et al., 2004; Reguera et al., 2000; Webster et al., 2006, 2007, 2008) correlano strettamente l'espressione aberrante del recettore KIT (CD117) al comportamento biologico del mastocitoma ed alla sua risposta alla chemioterapia con farmaci a bersaglio molecolare.

La nostra esperienza di indagine della reattività di questo recettore ad attività tirosinchinasica ha dimostrato che l'immunocitochimica è uno strumento estremamente efficace per dimostrare la presenza di questo antigene: in circa il 95% dei casi a noi pervenuti è stato possibile documentare la positività al KIT delle cellule neoplastiche.

E' stato effettuato un lavoro in parallelo con l'immunoistochimica su 25 casi di mastocitoma cutaneo canino (Cesari et al., 2008) che ha permesso di valutare la concordanza tra le due tecniche per quanto riguarda la valutazione del KIT pattern e la delocalizzazione del segnale. Questo lavoro ha permesso di evidenziare come la concordanza tra le due tecniche sia moderata sulla valutazione del KIT pattern e come sia buona sulla valutazione della delocalizzazione. Sono stati indagati i motivi di tali discrepanze e sono state messe in luce alcune delle possibili cause di divergenza tra le due tecniche:

Immunoistochimica:

- il coartamento delle cellule dovuto ad una fissazione non ottimale riduce l'area citoplasmatica addensando la positività in esso contenuta. Questo può portare ad un errore di valutazione con una sovrastima del KIT pattern;
- una sezione eccessivamente spessa può causare la sovrapposizione di più piani di cellule positive causando ancora una sovrastima del KIT pattern;
- tempi di fissazione eccessivamente lunghi in formalina portano ad una alterazione dell'immunoreattività dei preparati, causando potenzialmente una sottoespressione, e quindi una sottostima, della positività immunoistochimica del recettore KIT

Immunocitochimica:

- i preparati immunocitochimici presentano maggiori difficoltà di lettura, soprattutto per quanto riguarda l'interpretazione delle positività “border line” che tendono quindi a venir giudicate in base a criteri soggettivi;
- la tecnica immunocitochimica vede la presenza di un maggior numero di preparati non reattivi o non valutabili legati a:
 - errori durante la fissazione (tipi e temperature di fissativo errati o tempi di fissazione non ottimali);
 - errori nello stoccaggio del materiale citologico (campioni fissati e/o non fissati mantenuti a temperatura ambiente per tempi eccessivi) e contaminazioni (stoccaggio dei preparati in ambienti polverosi o a contatto con possibili contaminanti, es: formalina post-fissazione);
 - errori nell'allestimento dello striscio (ammassi cellulari troppo fitti qualora lo striscio non sia stato adeguatamente “steso” o cellule rotte nel caso in cui lo striscio sia stato effettuato in modo troppo energico);
 - assenza di cellule diagnostiche nel preparato;
 - presenza di artefatti (es: contaminazione di gel da ecografia, talco proveniente dai guanti ed altri materiali che possono interferire col funzionamento degli anticorpi). E' da notare come gli artefatti possano presentarsi casualmente anche nei preparati immunoistochimici, tuttavia la tecnica istologica gode di indubbi vantaggi rispetto al corrispettivo citologico in quanto ha la possibilità di valutare preventivamente, tramite una colorazione ematossilina-eosina, le qualità della sezione che si andrà a testare (il che permette di non sprecare anticorpi). In istologia è inoltre possibile riorientare un pezzo qualora si scopra che la suddetta sezione non sia adeguata per un qualunque motivo, ed infine:
 - la citologia lavora nell'impossibilità di avere il campione infinito su cui ripetere l'esame. Mentre l'istologia, grazie all'inclusione, si ritrova a disposizione un pool virtualmente infinito (almeno per quanto concerne l'indagine diagnostica) di sezioni su cui lavorare, la citologia, nel migliore dei casi, opera con un lieve margine di eccesso di allestimenti iniziali (che sarebbe sempre necessario, in quanto un preparato potrebbe risultare inadeguato a causa di uno dei sopra menzionati motivi). Molto più spesso però i vetri su cui applicare gli anticorpi sono appena

sufficienti o addirittura insufficienti per testare l'intero pannello anticorpale, costringendo il patologo a dover scegliere a quali possibili indicazioni diagnostiche rinunciare.

La colorazione di contrasto con May-Grünwald – Giemsa modificato, impiegata al fine di ottenere una colorazione di contrasto più leggera rispetto a quella fornita dalla colorazione standard, ha permesso una buona valutazione della morfologia cellulare consentendo allo stesso tempo una valutazione ottimale dell'immunopositività.

5.5 Conclusioni

Il comportamento biologico del MCT nel cane è stato correlato in vari studi a grado istologico, differenziazione, quantità di AgNOR, stadio clinico (Preziosi et al., 2004) ed attività proliferativa (Webster et al., 2007). E' stato dimostrato come nei mastocitomi il recettore KIT sia spesso sovraespresso, con comparsa di positività anche a livello di citoplasma e zone paranucleari (Preziosi et al., 2004) e come tale delocalizzazione del segnale abbia un significato prognostico sfavorevole (Gil da Costa et al., 2007; Preziosi et al., 2004; Webster et al., 2007). È stato inoltre rilevato che la comparsa di intensa positività citoplasmica è correlata a mutazioni attivanti del proto-oncogene *c-kit* (Webster et al., 2006, 2007), il che fa considerare tali casi come candidati ottimali per la terapia a bersaglio molecolare con farmaci inibitori delle tirosin-chinasi (London et al., 2003).

Nei casi testati è stato possibile verificare una buona corrispondenza fra immunocitochimica ed immunoistochimica che hanno mostrato risultati abbastanza sovrapponibili nella dimostrazione della delocalizzazione del recettore. Non esistono ancora in bibliografia dei lavori che attestino quale di queste due tecniche sia la più efficace nel rappresentare concretamente il comportamento di tale tipo di neoplasia, per cui saranno necessari degli studi corredati di andamento della malattia e sopravvivenza al fine di attribuire il titolo di metodica di riferimento ad una delle due.

La rivelazione del KIT pattern su preparati citologici potrebbe pertanto permettere di ottenere in tempi rapidi utili informazioni prognostiche su campioni prelevati in modo non invasivo già prima della chirurgia o in fase di stadiazione, permettendo

così di impostare precocemente i più adeguati interventi terapeutici. Nei casi in cui la sola chirurgia non possa essere risolutiva (recidive, diffusione metastatica, forme viscerali) potrebbe dare inoltre utili indicazioni sull'opportunità del trattamento con farmaci antitirocinici.

BIBLIOGRAFIA

Abadie J.J., Amardeilh M.A. and Delverdier M.E. (1999): Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 215:1629-1634.

Ayl R.D., Couto C.G., Hammer A.S., Weisbrode S., Ericson J.G. and Mathes L. (1992): Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Vet Pathol.* 29:386-390.

Bostock D.E., Crocker J., Harris K. and Smith P.(1989): Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer.* 59:915-918.

Cesari A., Bettini G., Scarpa F., Morini M., Marconato L., Capitani O. e Zini E. (2008): Espressione del recettore KIT (CD117) nel mastocitoma di cane: confronto citologia-istologia in 26 casi. Atti dell'Incontro sul Mastocitoma della Società Italiana di Oncologia Veterinaria (SIONCOV), Cremona (11-12 Ottobre), 2008.

Downing S., Chien M.B., Kass P.H., Moore P.E. and London C.A. (2002): Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res.* 63:1718-1723.

Gieger T.L., Théon A.P., Werner J.A., McEntee M.C., Rassnick K.M. and DeCock H.E. (2003): Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). *J Vet Intern Med.* 17:687-692.

Gil da Costa R.M., Matos E., Rema A., Lopes C., Pires M.A. and Gärtner F. (2007): CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Vet Res.* 3:19.

Gleixner K.V., Rebuzzi L., Mayerhofer M., Gruze A., Hadzijušević E., Sonneck K., Vales A., Kneidinger M., Samorapoompichit P., Thaiwong T., Pickl W.F., Yuzbasiyan-Gurkan V., Sillaber C., Willmann M. and Valent P. (2007): Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells. *Exp Hematol.* 35:1510-1521.

Goldshmidt M.H. and Hendrick M.J. (2002): Tumours of the skin and soft tissues. In: Tumors of domestic animals 4° edizione Iowa: Iowa State Press 105-107.

Hahn K.A., Oglivie G., Rusk T., Devauchelle P., Leblanc A., Legendre A., Powers B., Leventhal P.S., Kinet J.P., Palmerini F., Dubreuil P., Moussy A. and Hermine O. (2008): Masatinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 22:1301-1309

Isotani M., Ishida N., Tominaga M., Tamura K., Yagihara H., Ochi S., Kato R., Kobayashi T., Fujita M., Fujino Y., Setoguchi A., Ono K., Washizu T. and Bonkobara M. (2008): Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med.* 22:985-988.

Isotani M., Tamura K., Yagihara H., Hikosaka M., Ono K., Washizu T. and Bonkobara M. (2006): Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet Immunol Immunopathol.* 114:168-72

Kiupel M., Webster J. D., Kaneene J. B., Miller R. and Yuzbasiyan-Gurkan V. (2004): The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol.* 41:371-377.

Kiupel M., Webster J.D., Miller R.A. and Kaneene J.B. (2005): Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52:280-286.

Kravis L.D., Vail D.M., Kisseberth W.C., Ogilvie G.K. and Volk L.M. (1996): Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 209:1418-1420.

Lachowicz J.L., Post G.S. and Brodsky E. (2005): A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 19:860-864.

Lee Gross T., Ihrke P.J., Walder E.J. e Affolter V.K. (2005): Skin Diseases in dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis. Blackwell Science Ltd, Oxford

London C.A., Galli S.J., Yuuki T., Hu Z.Q., Helfand S.C. and Geissler E.N. (1999): Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol.* 27:689-697.

London C.A., Hannah A.L., Zadovoskaya R., Chien M.B., Kollias-Baker C., Rosenberg M., Downing S., Post G., Boucher J., Shenoy N., Mendel D.B., McMahon G. and Cherrington J.M. (2003): Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 9:2755-2768.

London C.A., Kisseberth W.C., Galli S.J., Geissler E.N. and Helfand S.C. (1996): Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *J Comp Pathol.* 115:399-414.

Ma Y., Longley B.J., Wang X., Blount J.L., Langley K. and Caughey G.H. (1999): Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol.* 112:165-170.

Marconato L., Bettini G., Giacoboni C., Romanelli G., Cesari A., Zatelli A. and Zini E. (2008): Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *J Vet Intern Med* 22:1001-1007.

Miettinen M. and Lasota J.(2005): KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 13:205-220.

Moore A.S. and Ogilvie G.K. (2006): Mast cell tumors. In: *Managing the Canine Cancer Patient.* Yardley, P.A.: Veterinary Learning Systems 643-656.

Morini M., Bettini G., Preziosi R. and Mandrioli L.(2004): C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* 52:705-708.

Mullins M.N., Dernell W.S., Withrow S.J., Ehrhart E.J., Thamm D.H. and Lana S.E. (2006): Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 228:91-95.

Patnaik A.K., Ehler W.J. and MacEwen E.G. (1984): Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol.* 21:469-474.

Preziosi R., Morini M. and Sarli G. (2004): Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *J Vet Diagn Invest.* 16:554-561.

Reguera M.J., Rabanal R.M., Puigdemont A. and Ferrer L. (2000): Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am J Dermatopathol.* 22:49-54.

Riva F., Brizzola S., Stefanello D., Crema S. and Turin L. (2005): A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. *J Vet Diagn Invest.* 17:385-388.

Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F. and London C.A. (2007): Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 44:335-341.

Serve H., Yee N.S., Stella G., Sepp-Lorenzino L., Tan J.C. and Besmer P. (1995): Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *EMBO J.* 14:473-483.

Sfiligoi G., Rassnick K.M., Scarlett J.M., Northrup N.C. and Gieger T.L. (2005): Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 226:1368-1374.

Simoes J.P., Schoning P. and Butine M. (1994): Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol.* 31:637-647.

Serve H., Yee N.S., Stella G., Sepp-Lorenzino L., Tan J.C. and Besmer P. (1995): Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *EMBO J.* 14:473-483.

Thamm D.H. and Vail D.M. (2007): Mast cell tumors. In Withrow & MacEwen's *Small Animal Clinical Oncology*. 4^o edizione Philadelphia: W.B. Saunders Co. 402-424.

Timokhina I., Kissel H., Stella G. and Besmer P. (1998): Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J.* 17:6250-6262.

Turrel J.M., Kitchell B.E., Miller L.M. and Théon A. (1988): Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 193:936-940.

Vosseller K., Stella G., Yee N.S. and Besmer P. (1997): c-kit receptor signaling through its phosphatidylinositide-3'-kinase-binding site and protein kinase C: role in mast cell enhancement of degranulation, adhesion, and membrane ruffling. *Mol Biol Cell.* 8:909-922.

Webster J.D., Kiupel M., Kaneene J.B., Miller R. and Yuzbasiyan-Gurkan V. (2004): The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 41:371-377.

Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J.B., Miller R.A., Resau J.H. and Kiupel M. (2006): The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia*. 8:104–111.

Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B. and Kiupel M. (2007): Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol*. 44:298-308.

Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Thamm D.H., Hamilton E. and Kiupel M. (2008): Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Vet Res.*, 4:32.

Yee N.S., Paek I. and Besmer P. (1994): Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *J Exp Med*. 179:1777-1787.

Zemke D., Yamini B. and Yuzbasiyan-Gurkan V. (2002): Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol*. 39:529-535.

Immunohistochemical expression of h-telomerase reverse transcriptase in canine and feline meningiomas

Luciana Mandrioli^{1,*}, Serena Panarese¹, Alessandro Cesari¹, Maria Teresa Mandara², Paolo Stefano Marcato¹, Giuliano Bettini¹

¹*Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Italy*

²*Department of Biopathological Science and Hygiene of Animal and Food Production, School of Veterinary Medicine, Perugia, Italy*

Telomere length maintenance is regarded as a fundamental step in tumorigenesis, as most human brain tumors, including meningiomas, stabilize the ends of their chromosomes using telomerase. This investigation represents an introduction to telomerase expression in canine and feline meningiomas. Twenty-five archived cases (14 dogs and 11 cats) were immunohistochemically tested for human-telomerase reverse transcriptase (h-TERT), scored, and quantified; furthermore, mitoses were counted on sections stained with a modified toluidine blue. The h-TERT antibody immunolabelled the nucleus and nucleolus of meningeal neoplastic cells, with an intensity ranging from mild to strong and a speckled distribution; a significantly higher expression in cats was noted, while no significant association between h-TERT immunolabelling and sex or histotype was evident in dogs or cats. The telomerase enzyme represents a fundamental parameter of potential malignant transformation, which may occur independently of the signal to proliferate, thereby supplying the cells with unlimited growth capabilities. Telomerase expression could be a prognostic indicator independent of the kinetic parameters, although this should be evaluated using a larger dataset with available clinical information.

Key words: cat, dog, h-telomerase reverse transcriptase, immunohistochemistry, meningioma

Introduction

Telomerase is a ribonucleoprotein complex that prevents the erosion of chromosomal extremities (telomeres) in eukaryotes. These sequences are composed of multiple G-rich repeats and an abundance of associated proteins.

The telomerase enzyme is formed by an RNA component and a reverse transcriptase, the catalytic subunit which is considered to be the primary determinant for its activity [5]. The human-telomerase reverse transcriptase (h-TERT) immunohistochemistry (IHC) supplies an indirect indication of the presence of the enzyme.

Maintenance of telomere length is essential for tumorigenesis, as most human tumors stabilize their chromosome ends using telomerase [5]. Many types of tumors, including brain cancers, have been studied by utilizing these procedures. Meningiomas, which may arise anywhere along the meninges, are the most common types of primary brain tumors in domestic animals; they are usually discrete, slow growing masses with smooth surfaces and broad dural attachments [3].

Recently, a subset of 27 canine meningiomas was tested for telomerase immunoreactivity, and TERT expression was found to be significantly correlated with the MIB1 antibody labelling index [4].

The aim of this study was to expand the present knowledge regarding telomerase expression in both canine and feline meningiomas.

Materials and Methods

Twenty-five cases of meningiomas (14 canine and 11 feline) were selected and classified according to the World Health Organization (WHO) scheme [3].

h-TERT immunohistochemistry

Replicate sections were tested for the presence of the enzymatic catalytic subunit of telomerase, h-TERT. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min; slides were immersed in citrate buffer (pH 6.0), heated for two 5 min periods in a microwave oven at 750 W. The primary antibody, an anti-human TERT (Clone 44F12, diluted 1 : 50 in PBS; Novocastra, UK), was applied to the slides

*Corresponding author
Tel: +39-51-2097970; Fax: +39-51-2097968
E-mail: luciana.mandrioli@unibo.it

overnight at 4°C, followed by a streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB Kit; Dako, Netherlands) and diaminobenzidine (0.04% for 7 min) as chromogen. Sections were then counterstained with Papanicolaou hematoxylin, rinsed in tap water, dehydrated, and mounted. An isotype-matched IgG negative control was run on each section. Canine normal testis was used as a positive tissue control.

The h-TERT index was assessed by an image analyzer (Lucia 32G/Mutech; Nikon, Japan) in ten fields ($\times 20$ lens) and expressed as the percentage of positive cells. Furthermore, h-TERT labelled cells were subjectively estimated using semiquantitative grading, in which 0 indicated the absence of positive cells, 1 was 1-10% of positive cells, 2 was 11-30% of positive cells, 3 was 31-60% of positive cells, and 4 was more than 61% of positive cells.

Mitosis count

Mitoses were counted in five fields ($\times 40$ lens) on replicate sections stained with a toluidine blue technique, which was modified to enhance the detectibility of mitotic figures [1]. Mitotic activity was then graded as low (L): 0-5 mitoses, or high (H): >6 mitoses.

Statistical analysis

Parametric one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare h-TERT values with histologic type, gender and species. Simple logistic regression analysis was used to evaluate the association between the two tested methods (subjective and automated).

A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

In canine meningiomas, the histotypes most often observed were meningothelial (7/14) and anaplastic (4/14), followed by fibroblastic (1/14), transitional (1/14), and psammomatous (1/14), with a strong predominance of females (9/14). Among cats, the transitional variety was mostly represented (6/11), followed by psammomatous (2/11) and anaplastic (2/11); a predominance of males was noted (7/11) (Table 1).

Concerning IHC, h-TERT protein was localized in the nucleus, notably the nucleolus, and was also occasionally found in the cytoplasm of neoplastic meningothelial cells (2 cases) (Fig. 1A-C) (Table 1). In three specimens out of 25, no signal was detected; in the remaining samples, the staining intensity ranged from mild to strong, being very variable from case to case. The distribution of immunoreactive cells was speckled throughout the slide; even the percentage was very variable, with the proportion of positive cells ranging from 0 to 90%. According to the adopted semiquantitative grading system of h-TERT immunopositivity, five cases were classified in group 0, seven in group 1, two in group 2, seven in group 3, and four in group

4 (Table 1).

The comparison of the two tested counting systems indicated a direct positive correlation between the two methods ($r = 0.881$; $p = 0.0000$).

h-TERT expression was higher in meningioma samples from cats than in those from dogs (automated count in dogs: mean 23.3%, range: 0.71-73.91%; automated count in cats: mean 42.3%, range 15.93-68.87%; $p = 0.06$). No other association was evident between h-TERT immunolabelling and sex or histotype for dogs or cats.

Modified toluidine blue staining (Fig. 2) was useful to appreciate a very low mitotic activity in the vast majority of meningiomas (L group: 21 out of 25); only four cases evidenced a high number of mitotic figures (H group: 4 out of 25), including three dogs (2 anaplastic, 1 meningothelial) and one cat (anaplastic meningioma) (Table 1).

No correlation between the number of h-TERT immunoreactive cells (telomerase expression) and their proliferative activity, assessed by mitotic count on toluidine blue-stained sections, was evident.

Discussion

In our series, canine meningiomas were more frequently found to be of the pure meningothelial type than of other types, although the WHO classification schemes report the transitional variety to be the most commonly observed in dogs [3]; nevertheless, the transitional variant shows features of both meningothelial and fibroblastic meningiomas. Furthermore, meningiomas occurred more frequently in female dogs and male cats; this finding mirrors the results of other reports [11], and has been putatively related to a dissimilar expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in canine and feline meningiomas [7].

Telomerase expression, which is assessed by h-TERT IHC, was displayed in expected locations, mainly nucleolar and nuclear locations, as previously reported, and also was rarely found in cytoplasmic locations [9]. Strong nucleolar staining may be explained as the presence of the telomerase holoenzyme, which is assembled within the nucleolus. The nuclear labelling may represent the active telomerase complex at the ends of the chromosome. Conversely, the cytoplasmic staining may be interpreted as the shuttling of telomerase holoenzyme from the nucleus, out to the cytoplasm, and then back into the nucleus during the assembly process [4]. This machinery is well-known because the relevance of telomerase in the process of tumoral transformation has been investigated thoroughly. In fact, its activation is considered to be a fundamental step in the "immortalization" of neoplastic cells, and has been suggested to play a key role in the progression of several tumors including human intracranial meningiomas [6]. The data obtained in the present study also seem to support this trend in canine and feline meningiomas.

Table 1. Synopsis of signalment, histological classification, telomerase expression, and mitotic activity in meningiomas from dogs and cats*

No	Species	Age (yrs)	Sex	WHO histotype	h-TERT staining pattern	h-TERT labelling index	h-TERT grading	Mitotic activity
1	Dog	17	F	Meningothelial	0	0	0	L
2	Dog	4	M	Meningothelial	N	0.83	0	H
3	Dog	9	F	Meningothelial	N, Nu	38.44	3	L
4	Dog	10	F	Meningothelial	0	0	0	L
5	Dog	8	F	Meningothelial	N	41.90	1	L
6	Dog	10	F	Meningothelial	N	22.46	2	L
7	Dog	7	F	Meningothelial	N	26.49	2	L
8	Dog	10	F	Fibroblastic	N, Nu, C	6.16	1	L
9	Dog	6	F	Transitional	N, Nu	42.12	1	L
10	Dog	11	M	Psammomatous	N, Nu, C	73.91	4	L
11	Dog	3	F	Anaplastic	N	2.01	1	H
12	Dog	5	M	Anaplastic	N	0.71	0	H
13	Dog	11	M	Anaplastic	N, Nu	69.74	3	L
14	Dog	12	M	Anaplastic	N	1.65	1	L
15	Cat	9	M	Transitional	N	49.90	3	L
16	Cat	5	M	Transitional	N, Nu	27.82	3	L
17	Cat	9	F	Transitional	N, Nu	56.06	4	L
18	Cat	12	M	Transitional	N, Nu	68.87	3	L
19	Cat	16	M	Transitional	N, Nu	15.93	1	L
20	Cat	15	M	Transitional	N, Nu	19.64	1	L
21	Cat	12	F	Fibroblastic	N, Nu	64.85	4	L
22	Cat	8	M	Psammomatous	0	0	0	L
23	Cat	12	F	Psammomatous	N, Nu	48.36	4	L
24	Cat	12	F	Anaplastic	N, Nu	54.09	3	H
25	Cat	12	M	Anaplastic	N, Nu	60.00	3	L

*h-telomerase reverse transcriptase (h-TERT) staining pattern; distribution within nucleus (N), nucleolus (Nu) and cytoplasm (C). h-TERT labelling index; number of cells assessed by image analysis, and expressed as percentage of positive cells. h-TERT grading; subjective evaluation, 0 (no cells are labelled), 1 (1-10% of cells are labelled), 2 (11-30%), 3 (31-60%), 4 (more than 61%). Mitotic activity; number of mitoses counted in 5 fields ($\times 40$), L (0-5 mitoses), H (more than 6 mitoses).

The correlation observed between the subjective semi-quantitative grading and the automated count was highly significant, considering the two systems to be interchangeable in the evaluation of h-TERT IHC. With both measurement systems, there was no appreciable relationship between h-TERT expression and the meningioma histotype, or with other variables such as gender and age. The h-TERT expression tended to be higher in samples from feline meningiomas than in canine meningiomas, and this may suggest a different role of the telomerase pathway between the two species, and may indicate a different prognostic significance.

In most human and animal tumors, the proliferative activity of neoplastic cells is directly related to the biological behavior. For this reason, the proliferative activity is considered to be a relevant prognostic factor that can be assessed by the counting of mitoses, or by the immuno-histochemical evaluation of proteins expressed throughout the cell cycle (i.e. Ki67 antigen recognized by MIB1

antibody) [10]. In this respect, arachnoid “cap” cells, from which meningiomas arise, have a slow rate of cell division [2], and therefore a high mitotic activity cannot be expected in their tumoral transformations. Noticeably, MIB1 immunostaining was ineffective in our series (data not shown). This behavior can be explained with prolonged storage of samples (in formalin or in paraffin blocks), which is responsible for subcellular modifications (i.e. cross-linking between proteins and/or nucleic acids that provides a strong steric hindrance creating an intricate physical barrier to antibodies employed in IHC) [8]. Therefore, the proliferative activity of tumor cells has been evaluated by counting mitoses in sections stained with a modified toluidine blue technique, which enhances the detectability of mitotic figures. Most cases prompted a very low proliferative activity (L group: 21 out of 25); only four cases displayed relatively high mitoses counts, which suggested a more aggressive phenotype, and three of these were grouped in the anaplastic histotype, that, among other meningioma

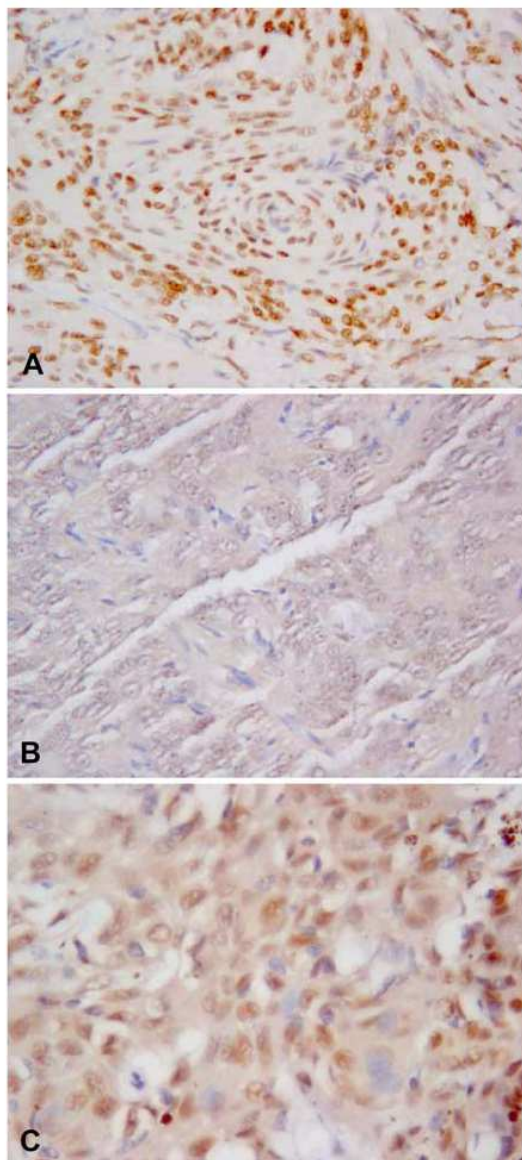


Fig. 1. Dog. Immunohistochemical staining of h-TERT in the nucleus (A), nucleolus (B), and cytoplasm (C) of neoplastic meningothelial cells. DAB chromogen. Counterstain with Papanicolaou hematoxylin. A; $\times 40$, B & C; $\times 63$.

variants, behaves in an aggressive fashion and carries a much poorer prognosis than do benign meningiomas (malignant meningioma).

Several studies have attempted to assess the proliferative potential and the existence of an association between meningioma recurrence and MIB1 labelling index in patient groups with low and high risk of recurrence, attributing a prognostic significance to the mitotic index and to the Ki-67

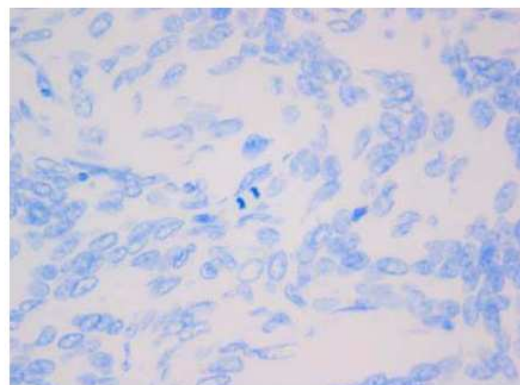


Fig. 2. Dog. A low mitotic activity (L group) is displayed. Modified toluidine blue stain. $\times 63$.

labelling index [12]; however, the actual prognostic relevance of these parameters remains controversial, heterogeneous, and of uncertain value [10]. In this respect, it has been postulated that h-TERT expression might be a relevant marker of progression towards recurrence and malignancy of meningiomas [6].

In the present study, no significant association between h-TERT expression and the histological type of meningioma or the mitoses count was evident, although a recent paper reports an association between h-TERT and MIB1 staining in canine brain tumors (meningioma and oligodendroglioma) [4]. A possible explanation for this is that telomerase activation, a fundamental parameter of potential malignant transformation, may occur independently of the signal to proliferate, thereby supplying the cells with unlimited growth capabilities [6].

These preliminary findings suggest that telomerase expression could play a role as a prognostic indicator that acts independently of kinetic parameters, although this should be evaluated using a larger dataset with available clinical information.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Ministry of Education, University and Research of the Italian Government (Scientific Research Programs of Relevant National Interest, PRIN 2005).

References

1. Chieco P, Pagnoni M, Romagnoli E, Melchiorri C. A rapid and simple staining method, using toluidine blue, for analysing mitotic figures in tissue sections. *Histochem J* 1993, **25**, 569-577.
2. Falavigna A, Santos JA, Chimelli L, Ferraz FA, Bonatelli

- Ad Ade P. Anaplastic meningioma: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 2001, **59**, 939-943.
3. Koestner A, Bilzer T, Fatzer R, Schulman FY, Summers BA, van Winkle TJ. Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic animals. Second Series. Vol. 5. pp. 27-29, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1999.
 4. Long S, Argyle DJ, Nixon C, Nicholson I, Botteron C, Olby N, Platt S, Smith K, Rutteman GR, Grinwis GCM, Nasir L. Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression and proliferation in canine brain tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006, **32**, 662-673.
 5. Maes L, Kalala JPO, Cornelissen R, De Ridder L. Telomerase activity and h-TERT protein expression in meningiomas: an analysis *in vivo* versus *in vitro*. *Anticancer Res* 2006, **26**, 2295-2300.
 6. Maes L, Kalala JPO, Cornelissen R, De Ridder L. Progression of astrocytomas and meningiomas: an evaluation *in vitro*. *Cell Prolif* 2007, **40**, 14-23.
 7. Mandara MT, Ricci G, Rinaldi L, Sarli G, Vitellozzi G. Immunohistochemical identification and image analysis quantification of oestrogen and progesterone receptors in canine and feline meningioma. *J Comp Pathol* 2002, **127**, 214-218.
 8. Nuovo GJ. The foundations of successful RT in situ PCR. *Front Biosci* 1996, **1**, c4-15.
 9. Panarese S, Brunetti B, Sarli G. Evaluation of telomerase in canine mammary tissues by immunohistochemical analysis and a polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest* 2006, **18**, 362-368.
 10. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW. Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. *J Neurooncol* 2005, **74**, 19-30.
 11. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. Tumors of the central nervous system. In: Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A (eds.). *Veterinary Neuropathology*. pp. 351-401, Mosby, St. Louis, 1995.
 12. Torp SH, Lindboe CF, Granli US, Moen TM, Nordtomme T. Comparative investigation of proliferation markers and their prognostic relevance in human meningiomas. *Clin Neuropathol* 2001, **20**, 190-195.

Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement

L. Marconato, G. Bettini, C. Giacoboni, G. Romanelli, A. Cesari, A. Zatelli, and E. Zini

Background: Mast cell tumors (MCTs) with bone marrow (BM) involvement are poorly documented in dogs and are associated with a poor prognosis. Successful treatment strategies have not been described.

Hypothesis: Clinicopathologic findings of affected dogs are not specific. Administration of lomustine or imatinib is beneficial.

Animals: Fourteen dogs with MCT and BM involvement.

Methods: Clinical and laboratory evaluations were performed in each dog on admission and during follow-up. All dogs received prednisone. Additionally, 8 dogs received lomustine and 3 dogs received imatinib. Imatinib was administered if tumor-associated tyrosine kinase KIT was aberrant.

Results: On admission, 11 dogs had a single cutaneous nodule and 3 dogs had multiple nodules. Involvement of regional lymph nodes, liver, or spleen was observed in each dog. BM infiltration with mast cells (MCs) was observed in all dogs. On CBC, nonregenerative anemia, leukopenia, or thrombocytopenia was common. Four dogs had circulating MCs. Increased alkaline phosphatase or alanine transferase activity was observed in 12 and 10 dogs, respectively. Treatment with lomustine induced partial remission in 1 of 8 dogs. Median survival time was 43 days (range, 14–57). Dogs on imatinib experienced complete remission. Two dogs survived for 117 and 159 days, and the third was alive after 75 days. Dogs treated symptomatically did not improve and were euthanized after 1, 14, and 32 days.

Conclusions and Clinical Importance: A combination of clinical and laboratory evaluation helps in identifying dogs with MCT and BM infiltration. Administration of lomustine is not helpful in affected dogs. The beneficial effect of imatinib warrants further investigation.

Key words: Canine; Mastocytoma; Molecular-targeted therapy; Systemic metastasis.

Mast cell tumors (MCTs) have extremely variable biologic behavior in dogs, ranging from strictly benign cutaneous masses to metastatic disease.^{1–3} Some dogs with cutaneous MCTs have no clinical signs, but those with visceral and bone marrow (BM) involvement may suffer from serious disease.^{4,5} Clinical signs are mainly related to the release of mast cell (MC) mediators, including histamine, heparin, and other vasoactive amines, which can lead to localized flushing, gastrointestinal signs, generalized pruritus, vasodilatory shock, and anaphylaxis.⁶ Moreover, MC infiltration itself may cause organomegaly, impairment of organ function, and, in the case of BM involvement, pancytopenia.⁴

MCs are rarely observed in BM cytology samples obtained from healthy dogs,^{4,7} and they may be increased in dogs with diseases other than MCTs, such as those with inflammatory skin diseases, enteritis, pancreatitis, heartworm disease, and parvovirus infection.⁸ In MCT, the

presence of neoplastic BM infiltration is rare, and it is generally more common in dogs with aggressive (grade III) primary cutaneous tumors.^{3,4,9–11} In a recent retrospective study, the incidence of BM infiltration at initial staging in dogs with cutaneous MCTs was 2.8%.¹² An additional retrospective study¹³ focused on the incidence of BM disorders in dogs. Among BM samples, metastatic MCs were found in 0.4% of specimens.¹³

Pertinent literature has emerged in the last decade with regard to therapeutic strategies for canine MCTs, covering several approaches such as surgery, radiation therapy, chemotherapy, electrochemotherapy, and photodynamic therapy.^{3,14–17} Among chemotherapeutic drugs, lomustine and vinblastine are considered the most active agents against neoplastic MCs.^{18–22} In recent years, the use of targeted drugs in the treatment of MCT has also been proposed.^{23,24}

MCs are derived from hematopoietic precursor cells that reside in BM and peripheral blood. The process of MC differentiation is influenced by cytokines and a stem cell factor (SCF) that represents the ligand for KIT, a transmembrane tyrosine kinase (TK) receptor encoded by the proto-oncogene *c-kit* and constitutively expressed by MCs.²⁵ In recent years, *c-kit* has been implicated in the pathogenesis of canine MCTs.²⁵ In 15–50% of dogs with MCT, *c-kit* mutations, especially in exon 11, have been detected and are considered responsible for ligand-independent KIT phosphorylation and for the subsequent autonomous proliferation of MCs.^{24–30} Additionally, a significant association of *c-kit* mutations with higher histologic grade and worse prognosis has been shown in dogs with MCTs.^{25,28,30} Recent studies have also suggested that KIT autophosphorylation leads to aberrant cytoplasmic localization of KIT, compared with MCTs that lack mutations and have normal peri-

From the Clinica Veterinaria L'Arca, Naples, Italy (Marconato, Giacoboni); the Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, University of Bologna, Ozzano Emilia, Italy (Bettini, Cesari); the Clinica Veterinaria Nerviano, Milano, Italy (Romanelli); the Clinica Veterinaria Pirani, Reggio Emilia, Italy (Zatelli); and the Clinic for Small Animal Internal Medicine, Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Zürich, Switzerland (Zini).

Findings of this study were presented in part at the Veterinary Cancer Society-European Society of Veterinary Oncology Joint Meeting, Copenhagen, Denmark, 2008.

Corresponding author: Laura Marconato, Clinica Veterinaria L'Arca, Vico Cacciottoli 46/47, 80129 Naples, Italy; e-mail: laura-marconato@yahoo.it.

Submitted November 13, 2007; Revised January 16, 2008; Accepted April 23, 2008.

Copyright © 2008 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2008.0128.x

membrane protein localization.^{30,31} Furthermore, aberrant KIT protein localization has been found to be significantly associated with increased cellular proliferation.³⁰

Recently, a number of potent TK inhibitors have been developed, with imatinib mesylate being among the most explored in humans.³² Imatinib directly inhibits the catalytic activity of KIT by interfering with the binding of adenosine triphosphate, thereby blocking TK phosphorylation and downstream signaling.³² Until now, few studies have investigated the efficacy of imatinib for treatment of MCTs in veterinary medicine, and most studies have been performed in cats or with canine cell culture lines.^{31,33–35} The optimal drug dosage and duration of treatment await investigation in dogs. Conversely, another TK inhibitor (SU11654) has been shown to have antiproliferative effects in canine MCT biopsy samples and measurable effects in dogs with different tumors, including MCTs.^{23,24}

A review of the literature failed to identify studies on treatments specifically aimed to eradicate MCTs with BM infiltration. Currently, disease progression in dogs with BM involvement is rapid and is associated with fatal outcome in most cases.⁴ Given the fact that cytopenias are common in affected dogs, the use of chemotherapy becomes more difficult and needs to be carefully balanced against adverse effects on BM cell progenitors.

Consequently, the primary aims of this study were to describe the clinicopathological features of canine MCT with BM infiltration and the clinical outcome of affected dogs treated with prednisone, lomustine, or imatinib. Furthermore, the antitumoral activity of the above-mentioned therapeutic agents and the development of toxicity were assessed in treated dogs.

Materials and Methods

Enrollment Criteria

Dogs with cutaneous MCTs, either solitary or multiple, and cytologically proven BM infiltration (stage IV based on the World Health Organization system for canine MCTs)³⁶ were eligible for recruitment. Dogs with second malignancies as well as those with concurrent nonneoplastic disorders, possibly contributing to systemic reactive mastocytosis,⁸ were excluded. In addition, dogs that received either chemotherapy or radiation therapy in the preceding 6 months were excluded. Finally, dogs were excluded from the study if they did not undergo complete staging.

Initial staging included history and physical examination, CBC with differential, serum biochemistry, liver function tests (pre- and postprandial bile acids), coagulation profile (activated partial thromboplastin time [aPTT], prothrombin time [PT], and plasma fibrinogen concentration), urinalysis (including urine protein to creatinine ratio), cytological evaluation of the cutaneous nodule(s) and regional lymph node(s), 3-dimensional measurement of the cutaneous nodule(s), thoracic radiographs (3 views), abdominal ultrasound examination, fine-needle aspirates of liver and spleen, and cytologic examination of BM obtained from the iliac crest.

Regarding visceral involvement, liver and spleen were considered to have metastatic disease if cytologic samples showed sheets or clusters of MCs. Isolated MCs were considered neoplastic if atypical on morphology or in the case of aberrant (cytoplasmic) KIT (CD117) expression.

No published information indicates how to determine whether the BM is affected by metastatic disease, and a clear cut-off number

for BM MCs has not been established. According to a previous study,⁴ BM was considered infiltrated if >10 MCs were present per 1,000 nucleated cells. In a more recent study, BM was considered infiltrated if >3–5% of all nucleated cells (ANC) were identified as MCs on cytology smears.²¹ Therefore, for the diagnosis of BM involvement to be made with confidence, we arbitrarily decided that MCs had to represent >10% of ANC in cytologic smears or, if atypical, >5% of ANC. Slides from each BM aspirate were stained with May Grünwald Giemsa (MGG) and examined for the presence of MCs. The number of MCs was expressed as a percentage of the total count of ANC.

In selected cases (specifically in those dogs whose owners considered targeted treatment), an antibody against the KIT receptor (CD117) was applied to cytologic samples of BM to evaluate the pattern of KIT expression in neoplastic MCs. Briefly, air-dried BM smears were postfixated in acetone and incubated overnight with rabbit anti-human CD117 polyclonal antibody^a (1:100); a streptavidin-biotin labeling system^a was used for immunolabeling, and the reaction was visualized with diaminobenzidine. A modified MGG stain (May-Grünwald solution for 1 minute, Giemsa solution diluted 1 drop/cm³ for 5 minutes) was used as a counterstain instead of hematoxylin to better differentiate MCs from immature myeloid cells that also can express CD117.

Treatment Designs

At the time of investigation, treatment with imatinib was very expensive; therefore, dogs were not randomly assigned to treatment groups. Rather, treatment group assignment was made on the basis of owner cost concern as follows: single-agent prednisone^b; lomustine and prednisone; or imatinib and prednisone. Regardless of the chosen treatment, all dogs received supportive care with the PO administration of H₁ (chlorpheniramine)^c and H₂ (ranitidine)^d histamine-blocking drugs. Prednisone was administered at a dosage of 20 mg/m² PO q12h; this dosage was gradually tapered and discontinued over 24 weeks. Drugs were started after staging was completed. All owners gave written informed consent.

Dogs receiving prednisone were re-evaluated at monthly intervals by means of CBC, serum biochemistry, BM examination, and abdominal ultrasound examination until death or euthanasia.

Lomustine^e was administered at a dosage of 60 mg/m² PO q28d. Because of possible myelosuppression and cumulative hepatic toxicity, CBC as well as liver enzyme activity and liver function tests were repeated 14 days after treatment and immediately before administration of the next dose of the drug. The other laboratory tests as well as complete staging were repeated at monthly intervals. The lomustine dosage was maintained for the duration of the study unless toxicity occurred or disease progressed.

Imatinib^f was administered at the dosage of 4.4 mg/kg PO q24h at the 1st morning meal. In cats, imatinib mesylate has been administered at dosages ranging from 5 to 10 mg/kg,³⁴ but similar information is not available for dogs. According to preclinical toxicology studies in dogs, imatinib administered PO at dosages ≥10 mg/kg was associated with gastrointestinal, hepatic, and hematologic toxicity, whereas a dosage of 3 mg/kg appeared to be safe.³⁷ Considering the above, we decided to treat dogs at a dosage of 4.4 mg/kg. Because tumoral expression of the *c-kit* gene product was required for this group of animals, KIT expression (including both intensity and localization) was established at baseline evaluation for each dog treated with imatinib. Dogs were treated for at least 1 month before evaluation of efficacy and safety. If treatment with imatinib was beneficial, treatment was continued until progression of disease or death. Complete staging was repeated at monthly intervals, whereas CBC and serum biochemistry were repeated biweekly.

Response Criteria

To evaluate response, clinical, radiologic, ultrasonographic, and laboratory investigation were repeated at the following time points: monthly during the first 6 months and every 3 months thereafter. Examinations were performed more frequently if deemed necessary. Furthermore, any new masses were evaluated cytologically. Response definitions included complete remission (CR), partial remission (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD). CR was characterized by disappearance of MC infiltrates in the involved sites at follow-up evaluation, absence of progression of systemic mastocytosis at other sites, active hematopoiesis with <10 MCs per 1,000 nucleated cells on BM cytology, and full recovery of blood counts with no detectable MCs on blood smears and a white blood cell count within normal limits. PR was defined as incomplete regression of MC infiltrates, with reduction of BM MCs by $\geq 50\%$ and to $<10\%$, CBC recovery with the persistence of few peripheral MCs ($<5\%$), reduction of hepatosplenomegaly, and $\geq 50\%$ decrease in 1 dimension in the cutaneous nodules. SD was defined as $<50\%$ decrease in 1 dimension, but no more than a 10% increase in any dimension of all measurable tumors, with marrow MCs reduced by $<50\%$. PD was defined as $\geq 10\%$ increase in any dimension of measurable tumor with no reduced or increased marrow MCs. Relapse was defined as cytologic evidence of MCT in any anatomical site in dogs that had CR, whereas relapse for animals with PR was defined as progression. Overall, survival was defined as the time between the 1st day of treatment and death.

Toxicity Evaluation

For Groups 2 and 3, adverse events related to treatment were assessed according to the guidelines of the Veterinary Co-Operative Oncology Group.³⁸

In general, in dogs experiencing Grade 2 nonhematological toxicity, treatment (either imatinib or lomustine) was withheld until toxicity had resolved to Grade ≤ 1 . In dogs having recurrent toxicity, treatment was withheld as above and the next dose was decreased by 25%. In dogs experiencing Grades 3–4 nonhematological toxicity, the study drug was withheld until the toxicity had resolved to Grade ≤ 1 , and the dose then was decreased by 50%.

For hematological toxicity, no dose reductions or interruptions were performed for Grades 1–2 toxicity, whereas in patients experiencing Grades 3–4 toxicity, treatment was withheld until toxicity was reduced to Grade ≤ 2 , and then resumed at the same dose. If Grades 3–4 toxicity recurred, treatment was withheld.

Results

Patient and Tumor Characteristics

Between April 2004 and August 2007, 14 dogs with previously untreated MCT and BM involvement were enrolled. There were 7 crossbreeds, 2 Rottweiler, and 1 each for Chow Chow, Labrador Retriever, Pekingese, German Shepherd, and Siberian Husky. Median age was 10 years (range, 16 months–15 years). Five dogs were intact males, 5 intact females, and 4 spayed females. Median body weight was 24.8 kg (range, 4.5–36.1).

Two dogs had no clinical signs (substage a), whereas the remaining 12 were symptomatic (substage b). The duration of clinical signs before referral ranged from 10 to 124 days (median, 21 days). Reported clinical signs were often vague and included lethargy in 10 dogs, decreased appetite in 9, weight loss in 7, vomiting in 4, and diarrhea or polyuria and polydipsia in 2 each. The major complaint for 1 dog was melena, whereas 2 dogs showed

intense generalized pruritus. The presenting clinical sign in another dog was straining to urinate and defecate.

At diagnosis, 11 dogs had a single cutaneous nodule and 3 had multiple nodules. MCTs were cytologically well differentiated or of intermediate differentiation in 4 dogs each or undifferentiated in 6 dogs. Regional lymph node involvement was cytologically confirmed in 10 dogs, and hepatic and splenic involvement was evident in 11 and 10 dogs, respectively. Three dogs had pulmonary involvement, as evidenced by a generalized peribronchial interstitial pattern in the caudodorsal lung fields in 1 dog, and by multiple pulmonary nodules in the others, and confirmed in 2 dogs by postmortem histopathologic evaluation, and in 1 dog by computed tomographic-guided cytologic examination. One dog had bilateral renal involvement.

Examination of BM identified infiltration of MCs in all dogs, ranging from scattered aggregates to complete effacing of the normal hematopoietic architecture (7–85% of ANC). Five dogs had normal CBC despite BM infiltration (7–33%).

Regarding CBC, at initial evaluation the median packed cell volume (PCV) was 32% (range, 12–51; reference range, 37–55). Three dogs had severe anemia (PCV $< 15\%$), 2 had moderate anemia (PCV 15–20%), and 4 had mild anemia (PCV 21–36%). Anemia was nonregenerative in all affected dogs (reticulocytes $< 40,000/\mu\text{L}$). Initially, the median white blood cell count was $7,800/\mu\text{L}$ (range, 2,600–12,900; reference range, 6,000–17,000). Moderate eosinophilia was present in 3 dogs, with a median value of 2,100 eosinophils/ μL (range, 1,950–2,350; reference range, 100–1,250). In 4 dogs, circulating MCs were found on blood smear evaluation, making up 2–10% of nucleated blood cells. Thrombocytopenia was observed in 5 dogs (median, $95,000/\mu\text{L}$; range, 86,000–108,000; reference range, 120,000–350,000). Coagulation parameters were prolonged in 3 dogs, expressed as a 20% increase in PT and aPTT, but none of them had concurrent thrombocytopenia or increased fibrinogen concentration, excluding disseminated intravascular coagulation. Alkaline phosphatase activity (ALP) was increased in 12 dogs (median, 460 U/L; range, 202–790; reference, 0–160), and alanine transferase (ALT) was increased in 10 dogs (median, 78 U/L; range, 68–122; reference range, 0–65). Liver dysfunction was not observed.

Treatment Effects and Safety Data

At the end of the study, all dogs but one were dead with a median survival time of 41 days (range, 1–159). Response rates for all dogs are shown in Table 1.

Single-Agent Prednisone. Three dogs received single-agent prednisone with no improvement of clinical status. All of them experienced PD, eventually leading to euthanasia after 1, 14, and 32 days, respectively.

Lomustine and Prednisone. In addition to prednisone, 8 dogs were treated with lomustine at a dosage of 60 mg/m². The median number of lomustine treatments was 1 (range, 1–2). The original protocol was designed to last 6 months, but in all cases treatment was stopped earlier

Table 1. Clinical outcome.

ID	Treatment	Response	TTF/DFI (days)	Survival (days)
1	Single-agent prednisone	PD	No response	1
2	Single-agent prednisone	PD	No response	14
3	Single-agent prednisone	PD	No response	32
4	Lomustine	PD	No response	14
5	Lomustine	PD	No response	44
6	Lomustine	PD	No response	47
7	Lomustine	PD	No response	57
8	Lomustine	PD	No response	21
9	Lomustine	PD	No response	41
10	Lomustine	PD	No response	30
11	Lomustine	PR	41	46
12	Imatinib	CR	78	117
13	Imatinib and lomustine	CR	150	159
14	Imatinib and lomustine	CR	75 ^a	Alive

^aStill in CR.

TTF, time to treatment failure; DFI, disease-free interval; PD, progressive disease; PR, partial remission; CR, complete remission.

because of PD. Clinical improvement did not occur in most cases. Dog 11 achieved PR of 41 days duration after the 1st lomustine dose, but was eventually euthanized 5 days later after sudden worsening of its general condition, most likely because of massive degranulation, as assessed by hyperalgesia, edema of the neck and front legs, and massive gastrointestinal bleeding.

Toxicity induced by lomustine was evaluated at each visit. Five dogs experienced marked nonfebrile neutropenia by the 1st examination, 14 days after chemotherapy was started (median, 800 neutrophils/ μ L; range, 300–1,200). Among them, only 2 had peripheral cytopenia at presentation, including anemia ($n = 2$) and thrombocytopenia ($n = 1$). With the exception of Dog 4, for which euthanasia was requested by the owner at 14 days because of poor life quality, in the others treatment had to be delayed because of neutropenia. Unfortunately, in none of them could the 2nd dose of lomustine be administered because the disease was rapidly progressive, leading to euthanasia. Three dogs experienced no toxicity and received the 2nd dose of lomustine at the scheduled time. With regard to serum biochemistry, increase in ALP and ALT activities was present at diagnosis in 7 of 8 dogs and enzyme activity did not increase during the study period. The median survival time for all dogs was 43 days (range, 14–57 days).

Imatinib and Prednisone. Three dogs were treated PO with imatinib at a daily dosage of 4.4 mg/kg, in addition to prednisone.

At presentation, the 1st dog had BM infiltration, with MCs accounting for 33% of ANC. Nonetheless, CBC indicated no abnormalities. MCs infiltrating the BM were round and highly granulated and showed marked CD117 cytoplasmic staining. The dog demonstrated rapid clinical improvement with progressive disappearance of its preputial mass and metastatic inguinal lymph node and no reported drug-related toxicity. A repeated abdominal ultrasound examination 1 month after initiation of treatment disclosed substantial decrease in the

size of the liver and spleen, with no MCs observed on fine-needle aspirates in both organs. Furthermore, a BM aspirate performed at this same time indicated a decrease of MCs from 33 to 2% with a normal CBC. Based on these findings, the tumor response was defined as a CR. At 44 days, the dog was still in CR, also based on a BM evaluation. Despite the excellent response, 78 days after initial presentation, the MCT on the prepuce started to grow again. On ultrasound examination, enlarged sublumbar lymph nodes and hepatosplenomegaly were detected. Furthermore, BM cytology indicated increased MCs (35% of ANC) and peripheral mastocytosis (5%). Because of physical deterioration and onset of clinical signs, imatinib was stopped. Despite supportive care with antibiotics (enrofloxacin^g and amoxicillin/clavulanate),^h antiemetics (maropitant),ⁱ H₁ (diphenhydramine)^j and H₂ (ranitidine) antihistamines, and prednisone, the dog required 2 hospital admissions and 1 blood transfusion over 39 days, after which euthanasia was performed. The dog survived for 117 days.

In the 2nd case, peripheral blood was remarkable for the presence of tricytopenia and 10% circulating MCs. A BM aspirate identified marked decreases in the erythroid, myeloid, and megakaryocytic lineages, with MCs accounting for 85% of marrow cellularity and displaying strong and diffuse immunocytochemical cytoplasmic CD117 expression (Fig 1). Imatinib was started in the dog. CR was soon achieved, as assessed by disappearance of the interscapular MCT, marked size reduction of the metastatic prescapular lymph node, and normalization of CBC. The dramatic improvement of the clinical picture was accompanied by a marked reduction in MC numbers in the BM aspirate. After 1 month of treatment, BM evaluation indicated a notable reduction in the extent of MC infiltration, with MCs representing 4% of ANC. Furthermore, no MCs were observed on lymph node, splenic, and hepatic cytology. At subsequent reevaluation (Day 60), no clinicopathologic abnormalities were observed, with the exception of an increased number of BM MCs (11%). Because of this finding, lomustine at 60 mg/m² PO q28d was added to imatinib aiming to achieve a possible synergistic effect. By day 90, the dog had a normal CBC and abdominal ultrasound examination, 1% MCs in BM, and no cutaneous or regional lymph node relapse. CR lasted for an additional 2 months, after which the tumor relapsed in the BM, spleen, and liver, as assessed by cytologic evaluation (day 150). Because of pruritus and development of hemorrhagic diarrhea, the dog was hospitalized and supported with blood transfusion, diphenhydramine, ranitidine, and prednisone. During the following 9 days, the disease progressed with a dramatic increase in circulating and BM MCs (23 and 92%, respectively), and the dog eventually was euthanized on day 159.

On admission, the 3rd dog had BM-infiltrating MCs, accounting for 7% of ANC. MCs were highly atypical and showed aberrant KIT expression. No peripheral blood abnormalities were identified. The dog received daily imatinib and once monthly lomustine. Follow-up with physical examination, CBC, serum biochemistry, abdominal ultrasound examination, thoracic radiogra-

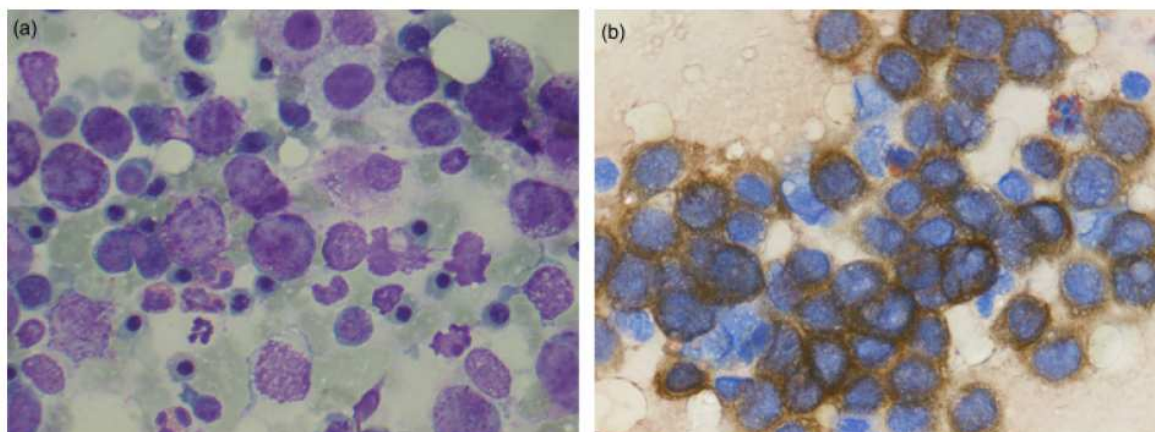


Fig 1. (a) Dog 13: bone marrow, myelophthisis. (b) Diffuse immunocytochemical cytoplasmic CD117 expression.

phy, and BM cytology indicated CR. At the time of reporting, 75 days after treatment was started, the dog was still being treated with imatinib and lomustine, showing no tumor relapse.

None of the dogs on imatinib required drug withdrawal or temporary interruption because of toxicity. Treatment was well tolerated, with no evidence of hematological or nonhematological adverse effects.

Discussion

Canine MCT with BM involvement is a rare condition for which successful treatment strategies are currently lacking, and affected dogs invariably have a poor prognosis.

In agreement with previous studies,^{4,9–11} our findings show that MCT with BM infiltration is aggressive in dogs, with 13 of 14 animals dying because of complications of mastocytosis or drug-resistant disease, with a median survival time of 41 days. In all cases, a combination of multi organ involvement and severe BM infiltration contributed to death. The initial clinical signs were vague and mainly attributable to local or systemic effects of MC mediators and organ infiltration. Clinical manifestations indicative of BM infiltration were often difficult to recognize. Indeed, because most dogs had more than 1 organ affected, nonspecific signs such as weakness, lethargy, and weight loss made the clinical picture more complex. As a consequence, the hypothesis of BM involvement relied on the fact that multi organ infiltration with MCs, peripheral blood cytopenias, or both were observed in all dogs.

Dogs with MC BM infiltration have a number of hematological abnormalities, including anemia, thrombocytopenia, leukopenia, leukocytosis, eosinophilia, and basophilia.^{4,5,12} Circulating MCs may be observed occasionally.^{4,8,12} Of note is the fact that 5 dogs in the present study showed no hematological abnormalities despite marked BM involvement (with MCs representing 7–33% of ANC). This finding has important clinical implication because lack of BM examination during staging may result in an underestimation of the number of patients harboring BM disease, possibly leading to

inadequate treatment. Unlike previous experiences in MCT staging that indicated no need for BM evaluation unless hematological abnormalities were identified,¹² our results suggest that BM cytology is necessary to accurately stage MCTs, especially when considering chemotherapy. It is well known that dogs with systemic disease involving the liver, spleen, or both have poor outcome and that BM evaluation may not add prognostic information. If conventional cytotoxic chemotherapy is considered in a dog with systemic involvement, BM evaluation may be necessary. Indeed, further hematological complications may occur with myelosuppressive chemotherapy, thereby reducing life quality and possibly survival. Splenic and hepatic disease with MC infiltration is a common finding in dogs with BM mastocytosis.^{4,9–11} In this cohort of dogs, 13 of 14 dogs had either liver or spleen involvement. Interestingly, hepatic dysfunction was not observed, as demonstrated by normal liver function tests. The ALP and ALT activities were frequently increased at presentation. However, because the activity was stable over the study period, we believe that these increases were attributable to a combination of neoplasia-induced stress leading to endogenous glucocorticoid release and to direct neoplastic hepatic infiltration.³⁹ The only dog with no hepatic or splenic involvement had pulmonary infiltration. Lung metastasis was also observed in 2 additional dogs, which is quite uncommon for canine MCT. Altogether, these findings emphasize the importance of thoracic radiography in the initial evaluation.

Historically, canine MCT with BM infiltration has been considered an extremely aggressive disease characterized by a rapid clinical course, with limited or no treatment options available. In recent years, much has been learned about MC biology and tumor-related genetic aberrations.²⁵ It was shown that normal MC development and proliferation involve the action of SCF on KIT receptors.⁴⁰ In some dogs with MCT, the occurrence of mutation in the *c-kit* gene leads to aberrant expression of KIT receptors, which ultimately promotes uncontrolled proliferation.^{26,27,29,30} Based on this finding, the identification of aberrant KIT expression may become a target for treatment of canine MCT. One drug developed to selec-

tively inhibit TK has been assessed in dogs with different tumors.^{23,24} The TK inhibitor SU11654 showed antitumor activity, especially in dogs with MCT.²⁴ However, the issue of how to treat marrow infiltration was not addressed.

Lomustine is an active agent for the treatment of canine MCT.^{3,22} In the study reported here, not only did lomustine not show any activity on MCs infiltrating BM, as assessed by rapid disease progression in all treated dogs, but also its use was associated with marked hematological toxicity (ie, neutropenia). Conversely, although used only in 3 dogs, imatinib was effective against MC BM infiltration, whereas neither single-agent prednisone nor lomustine improved survival. In response to imatinib therapy, the clinical signs resolved and the BM-infiltrating MCs disappeared in all affected dogs. Although single-agent prednisone may induce responses in up to 70% of dogs with MCTs,⁴¹ it is likely that imatinib partially contributed to the CR in treated dogs, because dogs receiving single-agent prednisone did not experience any objective response. Although the present results may support the use of imatinib for MCT with BM infiltration, acquired resistance to the drug may develop. In fact, in 2 dogs, treatment failure was observed after 78 and 150 days, respectively. During relapse, BM aspirates showed similar numbers of MCs as did specimens collected at initial presentation. In human medicine, resistance to imatinib is a major concern and is believed to be caused by mutations in the kinase domain interfering with imatinib binding.⁴² In addition, imatinib is a substrate of P-glycoprotein, a drug efflux pump that is highly expressed in hematopoietic stem cells, leading to low intracellular concentrations of the drug.⁴² To address the growing problem of relapse, molecular-targeted drugs may be integrated into pre-existing therapeutic regimens, with the goal of overcoming resistance and enhancing antitumor activity through a synergistic or additive effect. In human medicine, drug combination strategies are often applied based on the evidence that combining specific inhibition of tumor signal pathways together with more standard treatment can effectively enhance anticancer activity.⁴³ In dogs, no information is available on the interaction of novel anticancer drugs with other treatment modalities, and it is possible that successful long-term treatment of MCT with BM infiltration may require a combination of kinase inhibitors and conventional chemotherapy. Although preliminary, the results obtained in 2 imatinib-treated dogs may support such strategy. In fact, the 1 dog that was started on imatinib and later had lomustine added experienced the longest survival, whereas the other dog that simultaneously received imatinib and lomustine did not show any evidence of a systemic or BM relapse after more than 2 months of observation. Thus, a combination of imatinib, lomustine, and prednisone may yield maximal benefit. This hypothesis needs to be tested in additional clinical trials.

With regard to imatinib toxicity, in all treated dogs the drug was well tolerated without detectable adverse effects. Furthermore, imatinib seemed to spare normal hemopoietic cells, as demonstrated by effective hemopoiesis and repopulation of metastatic BM.

Although suggestive, this investigation has some limitations, such as the small number of animals studied and the fact that dogs were not equally distributed among treatments. As suggested by the literature, and confirmed by our study, which spanned 3 years, BM infiltration is rare in dogs with MCT, which limits the number of dogs available for investigation. Also, 8 dogs received lomustine, whereas only 3 dogs received imatinib. Unfortunately, imatinib is very expensive and prohibitive for many dog owners. Future larger studies assessing the efficacy of single-agent imatinib, with or without adjuvant chemotherapy, are warranted.

Footnotes

- ^aDakoCytomation, Glostrup, Denmark
- ^bDeltacortene, Bruno-Farmaceutici, Rome, Italy
- ^cRimeton, Shering-Plough, Milan, Italy
- ^dZantac, GlaxoSmithKline, Verona, Italy
- ^ePrava, Bristol-Myers Squibb, Baar, Switzerland
- ^fGlivec, Novartis Europharm Limited, Horsham West Sussex, UK
- ^gBaytril, Bayer HealthCare, Milan, Italy
- ^hSynulox, Pfizer, Rome, Italy
- ⁱCerenia, Pfizer
- ^jBenadryl, Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ

References

1. Bostock DE. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract* 1973;14:27-41.
2. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumour: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984;21:469-474.
3. Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. *Withrow & MacEwen's, Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 2007:402-424.
4. O'Keefe DA, Couto CG, Burke-Schwartz C, Jacobs RM. Systemic mastocytosis in 16 dogs. *J Vet Intern Med* 1987;1:75-80.
5. Takahashi T, Kadosawa T, Nagase M, et al. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). *J Am Vet Med Assoc* 2000;216:222-226.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2000:235-267.
7. Bookbinder PF, Butt MT, Harvey HJ. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1648-1650.
8. McManus PM. Frequency and severity of mastocytemia in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995-1997). *J Am Vet Med Assoc* 1999;215:355-357.
9. Pollack MJ, Flanders JA, Johnson RC. Disseminated malignant mastocytoma in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1991;27:435-440.
10. Davies AP, Hayden DW, Klausner JS, et al. Noncutaneous systemic mastocytosis and mast cell leukemia in a dog: Case report and literature review. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981;17:361-368.
11. Lester SL, McGonigle LF, McDonald GK. Disseminated anaplastic mastocytoma with terminal mastocytosis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981;17:355-360.
12. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, et al. Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs

with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999–2002). *Vet Comp Onc* 2007;5:31–37.

13. Weiss DJ. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996–2004). *J Vet Intern Med* 2006;20:955–961.

14. Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, et al. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:91–95.

15. LaDue T, Price GS, Dodge R, et al. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39:57–62.

16. Spugnini EP, Vincenzi B, Baldi F, et al. Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer Res* 2006;26:4585–4589.

17. Frimberger AE, Moore AS, Cincotta L, et al. Photodynamic therapy of naturally occurring tumors in animals using a novel benzophenothiazine photosensitizer. *Clin Cancer Res* 1998;4:2207–2218.

18. Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor: 41 cases (1992–1997). *J Vet Intern Med* 1999;13:491–497.

19. Thamm DH, Turek MM, Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci* 2006;68:581–587.

20. Hayes A, Adams V, Smith K, et al. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Onc* 2007;5:168–176.

21. Camps-Palau MA, Leibman NF, Elmslie R, et al. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997–2004). *Vet Comp Onc* 2007;5:156–167.

22. Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, et al. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *J Vet Intern Med* 1999;13:601–605.

23. Pryer NK, Lee LB, Zadovskaya R, et al. Proof of target for SU11654: Inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:5729–5734.

24. London CA, Hannah AL, Zadovskaya R, et al. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 2003;9:2755–2768.

25. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, et al. The role of c-KIT in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 2006;8:104–111.

26. London CA, Galli SJ, Yuuki T, et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 1999;27:689–697.

27. Downing S, Chien MB, Kass PH, et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:1718–1723.

28. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 2002;39:529–535.

29. Webster JD, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 2006;6:85–92.

30. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 2007;44:298–308.

31. Gleixner KV, Rebuzzi L, Mayerhofer M, et al. Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells. *Exp Hematol* 2007;35:1510–1521.

32. London C. Kinase inhibitors in cancer therapy. *Vet Comp Onc* 2004;2:177–193.

33. Kobie K, Kawabata M, Hioki K, et al. The tyrosine kinase inhibitor imatinib [STI571] induces regression of xenografted canine mast cell tumors in SCID mice. *Res Vet Sci* 2007;82:239–241.

34. Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2005;19:860–864.

35. Isotani M, Tamura K, Yagihara H, et al. Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;114:168–172.

36. Owen LN. *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, 1st ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1980:7–15.

37. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:935–942.

38. Veterinary Cooperative Oncology Group. Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats. *Vet Comp Onc* 2004;2:194–213.

39. Eckersall PD, Nash AS. Isoenzymes of canine plasma alkaline phosphatase: An investigation using isoelectric focusing and related to diagnosis. *Res Vet Sci* 1983;34:310–314.

40. Webster JD, Kiupel M, Kaneene JB, et al. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2004;41:371–377.

41. Stancliff RM, Gilson SD. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:53–62.

42. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876–880.

43. Pegram MD, Konecny GE, O'Callaghan C, et al. Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:739–749.

CASE REPORT

Feline intestinal T-cell lymphoma: assessment of morphologic and kinetic features in 30 cases

Alessandro Cesari,¹ Giuliano Bettini, Enrico Vezzali

1

Abstract. In this study, 30 feline intestinal T-cell lymphomas (ITCLs) from 77 cats with gastrointestinal lymphoma were evaluated. Neoplastic lesions were composed predominantly of small ($n = 21$) or medium to large ($n = 9$) anaplastic cells. Different patterns of tumor growth were observed. A starry-sky pattern was evident in 7 cases (23.3%), fibrosis in 18 cases (60%), and neovascularization in 19 cases (63.3%). The cell proliferation index (assessed by MIB1 [mindbomb homolog 1] immunohistochemistry) ranged from 0.21% to 66.91%. Mean MIB1 index was 3.49% within the first 33rd percentile, 18.31% within the second 33rd percentile, and 40.16% within the third 33rd percentile ($P < 0.000001$). Microscopic and kinetic features provided evidence that ITCL in cats exhibits a spectrum in cytological composition and growth patterns that could putatively reflect differences in biologic behavior.

Key words: Cats; cell proliferation index; immunohistochemistry; intestinal T-cell lymphoma.

Lymphoma is the most common hematopoietic neoplasm of the cat⁸ and represents one third of all neoplasms in this species.¹ In 2002, the World Health Organization (WHO) proposed a new classification system for domestic animal lymphomas,⁷ which was adapted from the human REAL (Revised European American Lymphoma) classification⁵ in addition to the consolidated Kiel classification² and the Working Formulation (WF) of the National Cancer Institute.³ With respect to previous systems, the WHO-REAL classification provides no separation between low, medium, or high malignancy grade tumors, except for follicular neoplasms. The identification of B- or T-cell lineage is critical,⁶ followed by further classification of B-cell lymphomas on the basis of their morphological characteristics. In contrast, T-cell lymphomas are classified on the basis of their anatomical location. In this study, primitive lymphomas of the gastroenteric tract, in particular those deriving from T cells, were evaluated.

The alimentary form of lymphoma is the most common in cats and represents 31% of all feline lymphomas.⁸ The current WHO-REAL classification⁷ tends to group all intestinal lymphomas derived from T lymphocytes in a single class (intestinal T-cell lymphoma [ITCL]), suggesting that all of these neoplasms have similar clinical characteristics and pathological patterns. This retrospective study aimed to verify the homogeneity of the ITCL class in 30 archived pathological tissue samples collected from cats diagnosed with intestinal T-cell lymphoma.

The alimentary lymphoma samples were collected and archived during 20 years of diagnostic service in the Pathology Division of the Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology of the University of Bologna, Italy. Specimens were collected from the intestine and mesenteric lymph nodes of affected cats during necropsy or surgical biopsy between 1984 and 2004. These specimens were fixed in 10% phosphate-buffered formalin (pH 7.2), processed routinely, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). Immunohistochemistry was performed on replicate tissue sections for cluster of differentiation 3 (CD3) and CD79 expression to confirm the diagnosis of T-cell lymphoma and to select appropriate cases for study.

On HE-stained sections, the size of lymphocytes was estimated relative to measurement of red blood cells (RBCs). Specifically, RBC size was used as a unit of measurement compared with the nuclear size of the lymphocytes (small lymphocyte nucleus, <2 times the RBC diameter; medium to large lymphocyte nucleus, ≥ 2 times the RBC diameter). Other assessed parameters included the presence of neovascularization, fibrosis, and macrophages containing lymphocytic debris (starry sky pattern). Immunohistochemistry was performed on replicate tissue sections with the use of antibodies to CD3^a and CD79a^b antigens to assess the cellular immunophenotype. Furthermore, sections were stained with MIB1 [mindbomb homolog 1] antibody,^c which recognizes the nuclear protein Ki67 antigen that is expressed only in proliferating cells. Endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 3% hydrogen peroxide for 30 min. Sections were then immersed in citrate buffer (pH 6.0) and irradiated twice for 5 min in a microwave oven at 750 W to retrieve antigenicity. The sections were allowed to cool to room temperature for 20 min, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. A streptavidin–biotin complex kit^d was used according to the manufacturer's instructions

From the Pathology Division of the Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy.

¹Corresponding Author: Alessandro Cesari, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Ozzano dell'Emilia, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy. alessandro.cesari2@unibo.it

to identify sites of primary antibody binding. Diaminobenzidine was used as the chromogen. Sections were then counterstained with Papanicolaou's hematoxylin, coverslipped,^e and examined microscopically.

Cases were classified as ITCL if a monomorphic infiltration of lymphocytes was present that stained positively for CD3 (>50% of cells) and negatively for CD79a. The percentage of neoplastic lymphocytes with positive MIB1 nuclear staining (proliferating cells) were assessed by image analysis and expressed as the MIB1 index. The image analysis system consisted of a light microscope^f and a digital camera^g connected to a personal computer from which images were acquired then analyzed and measured by dedicated software.^h

After confirmation of the diagnosis of alimentary lymphoma, only those cases of neoplasia with appropriate cellular morphology and minimal artifacts were considered for further investigation. Seventy-seven cases diagnosed as feline alimentary lymphoma were initially selected for review, but only 30 cases met the criteria for acceptable cellular morphology and CD3 immunoreactivity for classification as ITCL.

The age of the cats was known for 20 of the 30 individuals and ranged from 2 to 15 years of age. The average age was 8.8 years. Most of the cats were domestic shorthairs; other breeds were Persian (2 cases) and Siamese (1 case). Ten cats were males or neutered males, 11 were females or spayed females, and the sex was undetermined for 9 cats.

All intestinal specimens contained a dense lymphoid infiltrate that partially or completely invaded all the layers of the intestinal wall (muscularis mucosa, submucosa, and muscularis). Lymphocytes varied from small mature cells with condensed chromatin to large immature cells with fine chromatin, irregular nuclear profiles, and prominent nucleoli. Monomorphism of the lymphoid infiltrates was further evidenced by diffuse CD3 expression.

The nuclear size of lymphocytes varied from 1 to 5 times the diameter of the RBCs, with a prevalence of small-cell lymphoma (21 of 30 cases). A starry sky appearance, because of macrophages containing debris of dead lymphocytes, was observed in 7 of 30 cases (23.3%). Fibrosis was present in 18 of 30 cases (60%), and neovascularization was present in 19 of 30 cases (63.3%).

The MIB1 index ranged from 0.21% to 66.91%. Cases within the first 33rd percentile had a mean MIB1 index of 3.49% (range, 0.21%–9.26%; standard deviation [SD], 3.18%); cases within the second 33rd percentile had a mean MIB1 index of 18.31% (range, 13.4%–19.74%; SD, 2.10%); and cases within the third 33rd percentile had a mean MIB1 index of 40.16% (range, 22.75%–66.91%; SD, 15.73%). The statistical difference among the 3 percentile classes was highly significant (analysis of variance [ANOVA], $P < 0.000001$).

The nuclear size of the neoplastic lymphocytes correlated with proliferation activity. Large-cell lymphomas were more frequently represented in the high-proliferation category (first 33rd percentile, 6 small-cell and 4 large-cell lymphomas; second 33rd percentile, 4 small-cell and 6 large-cell lymphomas; third 33rd percentile, 3 small-cell and 7 large-cell lymphomas). Fibrosis occurred at a greater frequency in highly proliferative lymphoma (first 33rd

percentile, evidence of fibrosis in 5 cases; second 33rd percentile, evidence of fibrosis in 6 cases; third 33rd percentile, evidence of fibrosis in 7 cases). Conversely, other morphologic parameters (starry sky pattern and neovascularization) did not vary significantly according to the proliferation percentile.

The WHO-REAL classification of ITCL is primarily based on anatomic characteristics. After immunophenotyping to separate B-cell from T-cell lymphomas, the latter are divided on the basis of anatomic location without any further evaluation of malignancy. All ITCLs are grouped in the same class, suggesting that all of these neoplasms have the same morphologic characteristics and behavior.

Nevertheless, evaluation of simple morphological parameters in this study has shown some inconsistencies within the ITCL class, even in a small series of cases. The nuclear size of the neoplastic lymphocytes ranged from 1 to 5 times the diameter of the RBCs, and the starry sky pattern was present only in 23.3% of cases. Conversely, fibrosis was evident in 60% of the cases, whereas neovascularization was observed in 63.3% of the cases. These observations suggest that these parameters could be important diagnostic features of ITCL, although these criteria are not considered in the current WHO classification scheme.⁶ A similar variability in cellular morphology has also been observed in a smaller number of lymphomas involving the feline alimentary tract⁴: 6 ITCLs out of 23 alimentary lymphomas consisted of 4 small-cell lymphomas and 2 large-cell lymphomas, whereas every B-cell lymphoma was of the large-cell type.

The proliferation index (MIB1 index) revealed wide variability among intestinal lymphomas, even if they belonged to the same class. On the basis of the percentage of cycling cells, 3 subclasses were identified in this study that could putatively reflect a different biologic behavior. If cases were stratified according to the MIB1 index, the first 33rd percentile group had a low proliferation index (<10%), the second 33rd percentile had an intermediate proliferation index (10–20%), and the third 33rd percentile had a very high proliferation index (22%–70%). Among the various morphologic parameters considered, only nuclear size, and to a lesser degree fibrosis, seemed to correspond with proliferative activity.

A strong variability in morphologic characteristics and proliferative activity of ITCL was observed in this study. This lack of homogeneity contrasts with the idea that a single classification of neoplastic lymphocytes should have a similar appearance and biological behavior. To confirm or refute the premise that feline ITCL varies in its biological behavior, further studies are needed that evaluate a large series of neoplasms and assesses the clinical course of disease.

Sources and manufacturers

- a. Anti-human CD3 mouse monoclonal antibody, clone M7254, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark.
- b. Anti-human CD79a rabbit polyclonal antibody, clone M7051, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark.
- c. Anti-human Ki67 mouse monoclonal antibody, clone M7240, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark.
- d. K0690, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark.

- e. DPX mounting medium, Fluka, Riedel-de Haën, Switzerland.
- f. Nikon Eclipse 55i, Nikon, Tokyo, Japan.
- g. Nikon DS-U1, Nikon, Tokyo, Japan.
- h. Nikon Lucia G 5.0, Nikon, Tokyo, Japan.

References

1. Jacobs RM, Messick JB, Valli VE: 2002, Tumors of the hemolymphatic system. *In*: Tumors in domestic animals, ed. Meuten DJ, 4th ed., pp. 119–198. Iowa State Press, Ames, IA.
2. Lennert K: 1978, Malignant lymphomas—other than Hodgkin's disease. Springer-Verlag, Berlin.
3. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: 1982, Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 49:2112–2135.
4. Patterson-Kane JC, Perrins Kugler B, Francis K: 2004, The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol* 130:220–222.
5. Sweetenham JW, Smartt PF, Wilkins BS, et al.: 1999, The clinical utility of the Revised European-American Lymphoma (R.E.A.L.) Classification: preliminary results of a prospective study in patients with non-Hodgkin's lymphoma from a single centre. *Ann Oncol* 10:1121–1124.
6. Valli VE, Jacobs RM, Norris A, et al.: 2000, The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute Working Formulation. *J Vet Diagn Invest* 12:295–306.
7. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, et al.: 2002, Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. Armed Force Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC.
8. Waly NE, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ: 2005, Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J Comp Pathol* 133:253–260.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE IMMUNOCITOCHIMICA DI CD117 IN PREPARATI CITOLOGICI DA MASTOCITOMA

Cesari Alessandro⁽¹⁾, Marconato Laura⁽²⁾, Capitani Ombretta⁽³⁾, Bettini Giuliano⁽¹⁾

⁽¹⁾Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, ⁽³⁾Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna

⁽²⁾Clinica Veterinaria "L'Arca", Napoli

Il recettore CD117 (KIT o Stem Cell Factor Receptor) è una proteina transmembrana ad attività tirosin-chinasica normalmente presente nelle cellule germinali, nelle cellule mieloidi immature e nei mastociti. Nei mastociti è possibile verificare con l'immunoistochimica l'esclusiva localizzazione di CD117 a livello di membrana citoplasmatica; nel mastocitoma del cane e del gatto l'espressione di CD117 è mantenuta, ma spesso delocalizzata, con comparsa di intensa positività a livello intracitoplasmatico e paranucleare. Diversi studi hanno correlato la localizzazione di tale espressione (membrana citoplasmatica, citoplasma, paranucleare) al grado istologico e al comportamento biologico del mastocitoma, evidenziando la frequente associazione fra internalizzazione del recettore, minor differenziazione e comportamento più aggressivo. Inoltre, la localizzazione citoplasmatica del segnale immunoistochimico può indicare mutazioni attivanti del proto-oncogene c-kit, a suggerire una potenziale efficacia del trattamento con farmaci antitirocinasici.

Poiché la diagnosi di mastocitoma nel cane e nel gatto è generalmente raggiunta con ottima specificità tramite la citologia agoaspirativa, si è voluto verificare se l'applicazione di metodiche immunocitochimiche per il CD117 a preparati citologici normalmente allestiti poteva fornire le stesse indicazioni dell'immunoistochimica, quanto ad intensità e localizzazione della positività.

Nei casi testati è stato possibile verificare un'ottima corrispondenza fra i risultati delle due tecniche. È stato inoltre verificato che strisci post-fissati in acetone mantengono una soddisfacente immunoreattività per circa 10 settimane, mentre non è stato possibile recuperare la reattività nei preparati precedentemente colorati con May Grünwald – Giemsa.

Parole chiave: mastocitoma, CD117, c-kit, citologia, immunocitochimica.

INTRODUZIONE

Il mastocitoma (MCT) è una delle neoplasie cutanee più comuni del cane, in cui rappresenta il 7-21% di tutte le neoplasie cutanee. Il comportamento biologico del mastocitoma è molto variabile; mentre alcuni sono tendenzialmente benigni e trattabili con successo con la sola chirurgia, altri mostrano crescita rapida e tendenza a dare metastasi. Sono stati fatti vari tentativi al fine di predire il comportamento usando criteri come lo stadio clinico, l'indice di proliferazione e grado istologico. Quest'ultimo sembrerebbe essere il parametro predittivo più efficace e si basa principalmente sul sistema proposto da Patnaik, dove la valutazione della morfologia nucleare e la differenziazione delle cellule neoplastiche hanno un ruolo primario (5).

Il *c-kit* è un proto-oncogene che codifica per un recettore transmembrana di 14,5 kD (KIT o CD117, o Stem Cell Factor Receptor) che appartiene alla classe III della famiglia dei recettori ad attività tirosin-chinasica. Il ligando per il KIT è lo Stem Cell Factor (SCF), anche conosciuto come fattore di crescita dei mastociti. Il KIT svolge un ruolo fondamentale durante lo sviluppo fetale, fase in cui risulta espresso in molti tessuti; negli adulti l'espressione è invece mantenuta solo in un ristretto sottogruppo di cellule (cellule staminali emopoietiche, mastociti, linfociti intraepiteliali, cellule germinali, melanociti e cellule interstiziali di Cajal), in cui svolge ruoli di regolazione della differenziazione e della proliferazione cellulare (2).

In medicina umana è stata documentata la presenza di mutazioni di *c-kit* e conseguenti anomalie del recettore KIT in varie patologie dei mastociti come l'orticaria pigmentosa, la mastocitosi aggressiva e la leucemia mastocitaria, oltre che nei tumori stromali del tratto gastrointestinale (GISTs). Anche nel MCT canino sono state documentate varie anomalie di *c-kit* (mutazioni puntiformi, delezioni e duplicazioni), ed in vari casi di MCT ed è stato possibile correlarle ad una più spiccata aggressività da parte della neoplasia, in quanto potenziali responsabili dell'attivazione costitutiva del recettore KIT indipendente dall'interazione con il ligando, e quindi implicate nello sviluppo e nella progressione del tumore (7-8).

Il recettore KIT (CD117) è facilmente dimostrabile nei preparati istologici tramite immunocitochimica (IIC) (2); in particolare nei mastociti normali è apprezzabile una netta positività di membrana, che esprime la fisiologica localizzazione transmembrana del recettore, mentre nei mastociti neoplastici l'espressione del KIT può essere delocalizzata a livello citoplasmatico e paranucleare e alcuni studi hanno correlato questa

espressione aberrante al grado istologico (il pattern citoplasmatico diffuso è più frequente nei mastocitomi di grado I, mentre quello paranucleare nei mastocitomi di grado III) (5), alla prognosi (la presenza del KIT in sedi anomale sarebbe associata a una prognosi meno favorevole) (5-8), a mutazioni di *c-kit* (7-8) e alla potenziale efficacia del trattamento con farmaci antitirochinasi (1).

Considerata la potenziale utilità di una valutazione precoce dell'espressione del recettore KIT su preparati citologici ottenuti tramite agoaspirazione, che nella realtà clinica costituiscono il mezzo con cui è raggiunta con ottima sensibilità e specificità la diagnosi di MCT, in questo studio si è voluto verificare se l'applicazione di metodiche immunocitochimiche (ICC) per il CD117 a preparati citologici normalmente allestiti poteva fornire le stesse indicazioni dell'IIC, quanto ad intensità e localizzazione della positività.

MATERIALI E METODI

Lo studio ha riguardato casi di MCT canino diagnosticati citologicamente e in seguito rimossi chirurgicamente raccolti in un periodo di 6 mesi (novembre 2006 – aprile 2007). I campioni citologici sono stati ottenuti per agoaspirazione, strisciati su un vetro portaoggetti e lasciati asciugare all'aria; gli strisci per la valutazione citomorfologica sono stati colorati con May-Grünwald – Giemsa, mentre quelli destinati all'ICC sono stati fissati per 10 minuti in acetone raffreddato a 4°C. I campioni per l'istologia, derivanti dalla rimozione chirurgica del MCT, sono stati fissati in formalina al 10% tamponata a pH 7,2, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina eosina e blu di toluidina.

Immunocitochimica. Gli strisci non sottoposti immediatamente all'indagine ICC sono stati conservati a 4°C per un periodo variabile da pochi giorni a 10 settimane. Sui campioni fissati in acetone si procedeva a inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 10'), reidratazione (tampone TRIS per 10') e incubazione in camera umida con anticorpo policlonale di coniglio anti-CD117 umano (Dako; Dakopatts, Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS e 1% di BSA overnight a 4°C. Si procedeva poi a lavaggio (TRIS per 2'), incubazione con anticorpo secondario (IgG anti-rabbit biotinilato per 15'), ulteriore lavaggio in TRIS per 2', incubazione in streptavidina-perossidasi (15'), lavaggio in TRIS per 2' e rivelazione in diaminobenzidina 0,04% per 10'. Dopo ulteriori lavaggi in TRIS (2') e in acqua distillata (2') si procedeva a colorazione di contrasto con May-Grünwald – Giemsa modificato (soluzione

May-Grünwald 1' e 20", lavaggio in acqua distillata 1', soluzione Giemsa diluita 1 goccia/cc per 5') e montaggio in DPX.

Immunostochimica. Ulteriori sezioni istologiche sono state deparaffinate (2 bagni in Solvent Plus per 15') e reidratate in alcoli a concentrazione decrescente (3' ogni bagno). Si procedeva poi a inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 30'), riesposizione antigenica (2 cicli di 5' in forno a microonde a 750 Watt in tampone citrato pH 6 e raffreddamento a temperatura ambiente per 20'), incubazione in camera umida con anticorpo policlonale di coniglio anti-CD117 umano (Dako; Dakopatts, Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS e 1% di BSA overnight a 4°C. Dopo due lavaggi (TRIS per 5') si procedeva a incubazione con anticorpo secondario (IgG anti-rabbit biotinilato per 15'); seguivano due lavaggi (TRIS per 5'), incubazione in streptavidina-perossidasi (15'), due lavaggi (TRIS per 5') e rivelazione in diaminobenzidina 0,04% per 10'. Dopo un ultimo lavaggio in TRIS (5') ed uno in acqua distillata (5') i preparati erano contrastati con ematossilina di Papanicolaou e montati in DPX.

Valutazione della immunopositività. Nei preparati citologici e istologici la positività alla immunocolorazione per CD117 è stata valutata nei mastociti neoplastici in termini di localizzazione del segnale (M: membrana citoplasmatica; C: citoplasma; P: paranucleare) e di intensità dello stesso (+++: Intensa; ++: Moderata; +: Debole; -: assente).

RISULTATI

Lo studio ha riguardato 10 casi di MCT canino. In tutti i casi le procedure ICC e IIC hanno fornito un riscontro positivo; in tutti i 10 casi la positività IIC era evidente da moderata a intensa anche nel citoplasma, con marcati addensamenti nucleari in 3 casi. In tabella 1 sono presentati, caso per caso, i riscontri delle valutazioni ICC e IIC, che dimostrano un'ottima concordanza fra i due metodi, sia per intensità che per localizzazione dell'espressione del KIT.

Negli strisci sottoposti a ICC per KIT la morfologia cellulare si è mantenuta soddisfacente, a patto che gli strisci fossero correttamente allestiti (cellule integre in monostrato); in particolare gli ammassi multicellulari sono spesso risultati parzialmente negativi per insufficiente penetrazione dell'anticorpo; inoltre, se l'allestimento aveva provocato la rottura di numerose cellule si realizzava un fondo di intensa positività conseguente alla dispersione dell'antigene. Nella

valutazione dei preparati ICC l'utilizzo del May-Grünwald – Giemsa come colorante di contrasto (opportunamente modificato per ottenere una colorazione più tenue) ha permesso di distinguere più agevolmente gli elementi cellulari e di mantenere la metacromasia dei granuli dei mastociti.

E' stato inoltre apprezzato che gli strisci post-fissati in acetone hanno mantenuto una soddisfacente immunoreattività per circa 10 settimane se conservati a 4°C, e per circa 4 settimane se conservati a temperatura ambiente, mentre il tentativo di recuperare per l'ICC strisci già colorati con May-Grünwald – Giemsa (l'inibizione delle perossidasi determina la decolorazione degli strisci colorati) non ha avuto esito positivo.

Tabella 1.

Caso N°	Positività Immuno- Istochimica	Positività Immuno- Citochimica
Cane 1	C+++ P+++	C+++ P+++
Cane 2	C+++ P+++	C+++ P+++
Cane 3	M++ C+	M++ C+
Cane 4	C+	C+
Cane 5	M++ C+	M+
Cane 6	M++ C+	M++ C+++
Cane 7	C+++	C+++
Cane 8	M++ C+ P++	M+++
Cane 9	C+++	C+++
Cane 10	C++	C++

M=membrana citoplasmatica; C=citoplasma;
P=paranucleare
+++=Intensa; ++=Moderata; +=Debole

DISCUSSIONE

Il comportamento biologico del MCT nel cane è stato correlato in vari studi a grado istologico, differenziazione, quantità di AgNOR e stadio clinico (5) e attività proliferativa (8). Recentemente è stato evidenziato che il recettore KIT è spesso sovraespresso nei MCT, con comparsa di positività anche a livello di citoplasma e zone paranucleari (5) e che tali espressioni alterate sembrano avere importanza anche ai fini prognostici, in quanto collegate, anche se non in modo univoco, ad un comportamento più aggressivo (4-8). È stato inoltre rilevato che la comparsa di intensa positività citoplasmatica è correlata a mutazioni attivanti del proto-oncogene *c-kit* (7-8), il che fa considerare tali casi come candidati ottimali per la terapia a bersaglio molecolare con farmaci inibitori delle tirosin-chinasi (1).

Nei casi testati è stato possibile verificare un'ottima corrispondenza fra ICC e IIC, che hanno mostrato risultati quasi completamente sovrapponibili. La rivelazione del grado di espressione del KIT su preparati citologici potrebbe pertanto permettere di ottenere in tempi rapidi utili informazioni prognostiche su campioni prelevati in modo non invasivo già prima della chirurgia o in fase di stadiazione, permettendo così di impostare precocemente i più adeguati interventi terapeutici. Nei casi in cui la sola chirurgia non può essere risolutiva (recidive, diffusione metastatica, forme viscerali) potrebbe dare inoltre utili indicazioni sull'opportunità del trattamento con farmaci antitirocinasici.

with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Veterinary Pathology* 44 p 298–308

BIBLIOGRAFIA

1. London C. A., Hannah A. L., Zadovskaya R., Chien M. B., Kollias-Baker C., Rosenberg M., Downing S., Post G., Boucher J., Shenoy N., Mendel D. B., McMahon G. and Cherrington J. M. (2003): Phase I Dose-Escalating Study of SU11654, a Small Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Dogs with Spontaneous Malignancies. *Clinical Cancer Research* 9 p 2755-2768
2. Morini M., Bettini G., Preziosi R., and Mandrioli L. (2004): C-kit Gene Product (CD117) Immunoreactivity in Canine and Feline Paraffin Sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52(5) p 705–708
3. Murphy S., Sparkes A. H., Smith K. C., Blunden A. S., Brearley M. J. (2004): Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Veterinary Record* 154 p 743-746
4. Newman S. J., Mrkonjich L., Walker K. K., Rohrbach B. W. (2007): Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *Journal of Comparative Pathology* 136 p 231-239
5. Preziosi R., Morini M., Sarli G. (2004): Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16 p 554–561
6. Romansik E. M., Reilly C. M., Kass P. H., Moore P. F., London C. A. (2007): Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology* 44 p 335–341
7. Webster J. D., Kiupel M. and Yuzbasiyan-Gurkan V. (2006): Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 2006, 6:85
8. Webster J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R. A., Kaneene J. B., Kiupel M. (2007): Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations

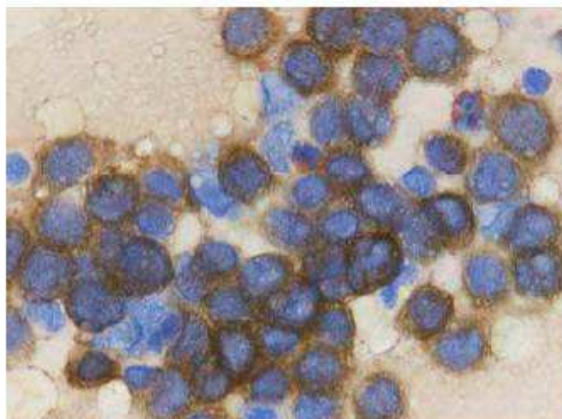


Figura 1. Cane, mastocitoma. Colorazione ICC per CD117 in un preparato citologico. Intensa positività citoplasmatica.

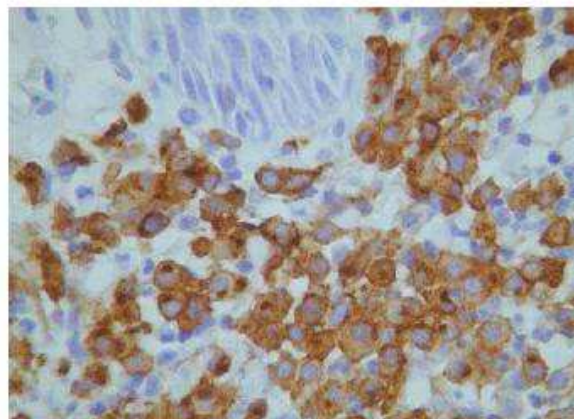


Figura 2. Cane, mastocitoma. Colorazione IIC per CD117 in un preparato istologico. Intensa positività citoplasmatica.

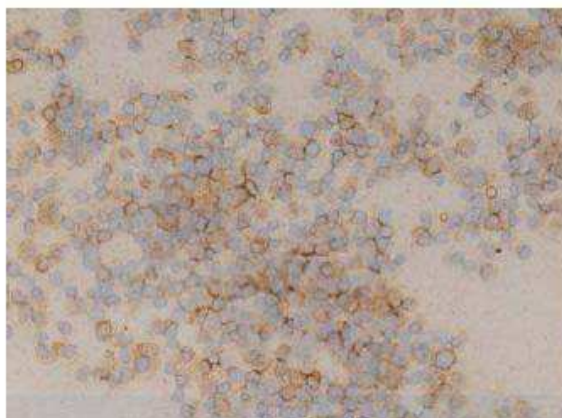


Figura 3. Cane, mastocitoma. Colorazione ICC per CD117 in un preparato citologico. Espressione prevalentemente di membrana.

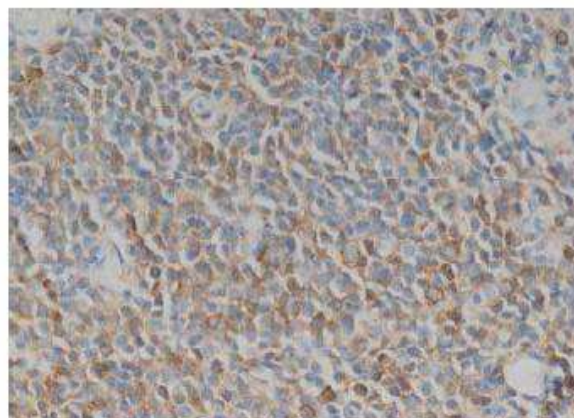


Figura 4. Cane, mastocitoma. Colorazione IIC per CD117 in un preparato istologico. Espressione prevalentemente di membrana.

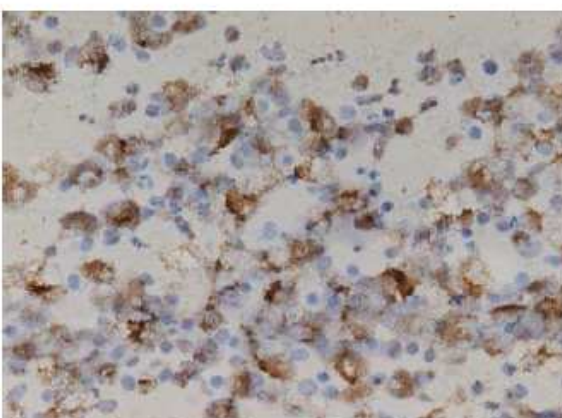


Figura 5. Cane, mastocitoma. Colorazione ICC per CD117 in un preparato citologico. Debole positività citoplasmatica con addensamenti paranucleari.

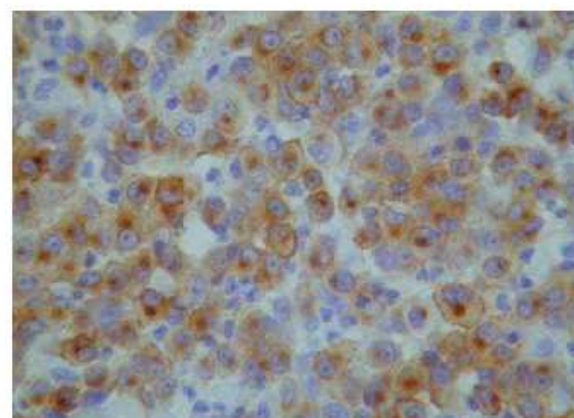


Figura 6. Cane, mastocitoma. Colorazione IIC per CD117 in un preparato istologico. Debole positività citoplasmatica con addensamenti paranucleari.

IMMUNOCYTOCHEMICAL EVALUATION OF CD117 EXPRESSION IN CYTOLOGIC SAMPLES OF MAST CELL TUMOR

The receptor CD117 (KIT o Stem Cell Factor Receptor) is a transmembrane tyrosine kinase protein normally present in germ cells, immature myeloid cells and mast cells. Immunohistochemistry reveals in mast cells its exclusive membranous localization, while in canine and feline mast cell tumor CD117 expression, although maintained, is often strongly evident also in the cytoplasm, especially as a paranuclear labelling. Several studies have correlated in canine mast cell tumors the location of KIT expression (membrane, cytoplasm, paranuclear) to histologic grading and biologic behaviour, and have verified a frequent association between its internal expression, poor differentiation and aggressive behaviour. Moreover, the cytoplasm labelling can indicate activating mutations of the *c-kit* proto-oncogene, suggesting a potential efficacy of the treatment with anti-tyrosinase drugs.

Since the diagnosis of mast cell tumor is generally achieved with great specificity by fine needle aspiration cytology, we tried to verify if the application of CD117 immunocytochemistry to cytologic samples could give the same information of immunohistochemistry, as for intensity and location of the positivity. In the tested cases, a good correspondence between the two techniques was verified. It was also observed that acetone fixed cytologic smears preserved their immunoreactivity for about 10 weeks, whereas it was not possible to retrieve the reactivity in the smears previously stained with May Grünwald – Giemsa.

Key words: mast cell tumor, CD117, c-kit, cytology, immunocytochemistry.



OSTEOSARCOMA DEL CANE. STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHIMICO DI 45 CASI

Scarpa Filippo, Bettini Giuliano, Cesari Alessandro

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università di Bologna*

E' stata condotta una indagine retrospettiva su 45 campioni di osteosarcoma (OS) di cane con l'obiettivo di classificarli in base al tipo istologico e di valutare il grado istologico e il possibile ruolo dell'immunoistochimica nella definizione diagnostica e prognostica.

La composizione della casistica ricalca i dati della letteratura scientifica: maggiore frequenza degli OS appendicolare rispetto agli assiali (80% vs 20%) e maggiore rappresentazione fra i primi delle localizzazioni agli arti anteriori rispetto ai posteriori (72,2% vs 27,8%) e di cani di taglia grande e gigante. L'istotipo più rappresentato e' risultato l'osteoblastico (66,7%) mentre gli altri istotipi sono stati osservati più raramente (fibroblastico 11,1%; a cellule giganti 8,9%; poco differenziato 6,7%; condroblastico 4,4%; teleangectasico 2,2%). Il grading istologico (che considera pleomorfismo nucleare, numero di mitosi e quantità di necrosi intratumorale) ha evidenziato la presenza dei gradi più alti (grado I: 28,2%; grado II: 41%; grado III: 30,8%) e non ha mostrato una evidente correlazione con l'istotipo.

Le prove immunoistochimiche oltre alla costante ed intensa espressione della vimentina hanno evidenziato in una rilevante percentuale di casi (76,9%) una inaspettata positività per l'actina da moderata ad intensa nel citoplasma delle cellule di OS non rapportabile all'istotipo o al grado istologico. L'attività proliferativa (AP), rilevata tramite valutazione analitica della percentuale di cellule positive per l'antigene nucleare Ki67 (anticorpo MIB1) è risultata molto eterogenea nell'ambito della casistica (range 0,4 – 60%) e significativamente correlata al numero di mitosi ed al grado istologico, ma non al grado di pleomorfismo nucleare, alla quantità di cellule necrotiche e al grado di espressione citoplasmatica di actina. Negli OS assiali l'AP è risultata mediamente più elevata rispetto agli appendicolari.

Parole chiave: osteosarcoma, cane, grading istologico, immunoistochimica , attività proliferativa.

INTRODUZIONE

L'osteosarcoma (OS) rappresenta l'85% dei tumori ossei primitivi del cane. Colpisce più spesso cani maschi di circa 7-8 anni, preferibilmente appartenenti a razze di taglia grande e gigante.

La localizzazione preferenziale è a livello di midollare metafisaria delle ossa dello scheletro appendicolare con predilezione per gli arti anteriori (soprattutto estremità distale del radio e prossimale dell'omero); meno frequenti le localizzazioni a livello di scheletro assiale.

Per definizione l'osteosarcoma è un tumore maligno a cellule fusate in cui la popolazione cellulare neoplastica è in grado di produrre matrice osteoide, osso immaturo od entrambe. I caratteri istologici possono essere molto eterogenei, come testimoniato dai diversi istotipi in cui è classificato l'OS (osteoblastico produttivo e non produttivo, condroblastico, fibroblastico, poco differenziato, teleangectasico, a cellule giganti), che tuttavia non sarebbero associati a diversità nel comportamento biologico. Alcuni studi hanno invece evidenziato una certa potenzialità prognostica del grading istologico, che è basato su pleomorfismo nucleare, quantità di necrosi intratumorale e numero di mitosi.

E' stata condotta un'indagine retrospettiva su 45 campioni di osteosarcoma di cane con l'obiettivo di classificarli in base al tipo istologico, valutare il grado istologico ed il possibile contributo dell'immunoistochimica alla definizione diagnostica e prognostica.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati dall'archivio del Servizio di Anatomia Patologica 45 campioni di OS di cane (tessuti fissati in formalina tamponata, decalcificati se necessario con EDTA o prodotti a base acida, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina-eosina) sui quali è stata condotta classificazione istopatologica secondo gli schemi OMS (Slayter et al., 1994) e, se di dimensioni adeguate, graduazione istologica secondo Straw et al. (1996) (tabella 1).

Mediante metodiche immunoistochimiche si è inoltre proceduto alla valutazione dell'espressione nei tessuti neoplastici di vimentina, actina e dell'antigene nucleare Ki67. A tale scopo sono state allestite ulteriori sezioni dello spessore di 4 µm, che sono state deparaffinate, reidratate e sottoposte a trattamento di inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno 0,3% in metanolo per 30 minuti). Le sezioni sono poi state immerse in tampone citrato a pH 6 e poste in forno a microonde a 750 W per 2 cicli di 5 minuti per la

riesposizione antigenica. L'incubazione con gli anticorpi primari (vimentina 1:100, actina 1:100, MIB1 1:30) è stata condotta overnight a 4° C. Per la rivelazione della reazione è stato impiegato un kit commerciale (DAKO LSAB Kit peroxidase). Come cromogeno è stata impiegata la DAB (0,04% per 10 minuti) e come colorazione di contrasto ematossilina di Papanicolaou. Dopo disidratazione in alcoolli a diluizioni crescenti e passaggio in xilolo, i preparati sono stati montati in DPX.

L'immunoreattività è stata considerata positiva se presente a livello citoplasmatico per vimentina ed actina mentre a livello nucleare per MIB1. Nel caso dell'actina è stata effettuata una valutazione semiquantitativa della percentuale di cellule positive. In particolare la reazione è stata giudicata actina-score 0 (reazione negativa del controllo interno rappresentato dalla parete dei vasi), 1 (controllo interno positivo, tumore negativo), 2 (fino al 50% delle cellule neoplastiche positive,) o 3 (quasi tutte le cellule neoplastiche positive). La determinazione del numero di cellule positive al MIB1 è stata invece ottenuta attraverso un sistema di analisi automatica di immagine (Nikon LUCIA G). Il conteggio videoassistito ha considerato il numero dei nuclei positivi rispetto ai nuclei totali effettuato su 5 campi per ogni preparato istologico ad ingrandimento 20x. Il grado di positività è stato poi espresso in percentuale come MIB1 index.

Si è infine cercato di valutare l'esistenza di eventuali correlazioni tra localizzazione della neoplasia (OS assiale o appendicolare), istotipo, grado istologico, singoli parametri che entrano nella formulazione del grado istologico (numero di mitosi, pleomorfismo nucleare, quantità di necrosi intratumorale), immunoreattività all'actina e attività proliferativa (MIB1 index) utilizzando il test di Kruskal-Wallis.

RISULTATI

Dall'esame dei dati relativi al segnalamento dei 45 casi di OS si è osservata la seguente distribuzione razziale: Pastore tedesco (24,4%), Meticcio (16,3%), Dobermann (8,9%), Pastore maremmano, Terranova (6,7%), Alano, Boxer, Rottweiler, Setter (4,4%), Bovaro delle fiandre, Bulldog francese, Corso, Dalmata, Drahatar, Levriero russo, Maltese, Pastore belga, Pastore scozzese, San Bernardo (2,1%). L'età media riscontrata era di circa 8 anni, e i maschi (29/45; 64,4%) erano in numero superiore rispetto alle femmine (16/45; 35,6%), con un rapporto maschi:femmine di 1,8:1. Gli OS esaminati interessavano prevalentemente lo scheletro appendicolare (36/45; 80%) e più raramente quello

assiale (9/45; 20%); in particolare la neoplasia era localizzata soprattutto a livello di arti anteriori (72,2%; estremità distale del radio/proximale dell'omero) rispetto ai posteriori (27,8%; estremità distale del femore/proximale della tibia). Gli OS appendicolari riguardavano soprattutto cani di taglia medio/grande (77,8%) o gigante (22,2%), mentre gli OS assiali sono stati rilevati anche in cani di taglia media e piccola. L'età media dei cani con OS appendicolare era 7,9 anni, e 8,4 anni nei cani con OS assiale (ANOVA: $p=0,65$). L'istotipo più rappresentato è risultato l'osteoblastico (66,7%), mentre gli altri istotipi sono stati osservati più raramente (fibroblastico 11,1%; a cellule giganti 8,9%; poco differenziato 6,7%; condroblastico 4,4%; teleangectasico 2,2%). Non era apprezzabile alcun rapporto fra tipo istologico e localizzazione, in quanto sia negli OS assiali che in quelli appendicolari l'istotipo maggiormente rappresentato era quello osteoblastico (tabella 2).

Dei 39 OS in cui la sezione disponibile aveva dimensioni sufficienti a consentire un'ideale valutazione dei parametri di grading istologico (tabella 1), 11 (28,2%) sono risultati di grado I, 16 (41%) di grado II e 12 (30,8%) di grado III. Gli OS appendicolari sono risultati per il 30% di grado I, per il 36,7% di grado II e per il 33,3% di grado III; per quanto riguarda invece gli OS assiali il 22,2% erano di grado I, il 55,5% di grado II e il 22,2% di grado III.

L'estrema prevalenza degli OS osteoblastici sugli altri istotipi non ha permesso di valutare statisticamente eventuali differenze nella distribuzione del grado istologico in rapporto al tipo istologico (tabella 3).

L'immunohistochimica ha evidenziato in tutti i casi una intensa positività citoplasmatica alla vimentina. In 30 casi su 39 (76,9%) si è anche rilevata una inaspettata positività immunohistochimica delle cellule neoplastiche all'actina, da moderata (actina-score 2: 28,2%) a intensa (actina-score 3: 48,7%), generalmente a focolaio nell'ambito della sezione. Di questi 30 casi, 20 (66,7%) erano OS osteoblastici, 4 (13,3%) a cellule giganti, 2 (6,7%) fibroblastici, 2 (6,7%) condroblastici, 1 (3,3%) teleangectasico ed 1 (3,3%) poco differenziato; in rapporto al grado istologico 10 (33,3%) erano di grado III, 13 di grado II (43,3%) e 7 di grado I (23,3%), senza apprezzabili differenze in rapporto alla localizzazione.

L'anticorpo MIB1 non ha mostrato alcuna reattività in 12 dei 39 osteosarcomi testati (30,8%). Nei 27 (69,2%) campioni reattivi era invece apprezzabile una positività nucleare molto eterogenea (MIB1 index variabile da 0,4 a 60%). Negli OS assiali l'AP è risultata mediamente più elevata rispetto agli appendicolari (28,63% vs 15,48%; $p\text{-value}=0,02$). Rispetto al tipo istologico, l'AP era pari al 20,3% in 17 OS

osteoblastici, 12,7% in 3 OS a cellule giganti, 8,4% in 2 OS poco differenziati, 17,2% in 2 OS fibroblastici 17,9% in 2 OS condroblastici e 27,4% in 1 OS teleangectasico ($p\text{-value}=0,7$). Nei 7 OS di grado I il MIB1-index era 9%, 19,7% negli 11 OS di grado II e 24,1% nei 9 OS di grado III ($p\text{-value}=0,01883$); quanto agli elementi morfologici che entrano nella formulazione del grading istologico, è stata rilevata una correlazione significativa del MIB1-index con la quantità di mitosi ($p\text{-value}=0,04371$) ma non con il grado di pleomorfismo nucleare e con la quantità di necrosi intratumorale ($p\text{-value}>0,05$). Infine, non era apprezzabile alcuna correlazione fra grado di immunopositività all'actina delle cellule neoplastiche e MIB1 index (actina-score 1: MIB1 index = 14,47%; actina-score 2: MIB1 index = 18,91%; actina-score 3: MIB1 index 19,18%; $p\text{-value}=0,5$).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La composizione della casistica ricalca i dati della letteratura scientifica: maggiore frequenza degli OS appendicolari rispetto agli assiali e maggiore rappresentazione fra i primi delle localizzazioni agli arti anteriori rispetto ai posteriori e di cani di taglia grande e gigante (Misdorp e Hart, 1979; Jongeward, 1985; Meuten, 2002). L'istotipo più rappresentato è risultato l'osteoblastico, mentre gli altri istotipi sono stati osservati più raramente. In merito alla classificazione istopatologica deve comunque essere segnalato che nell'ambito dello stesso campione è risultato estremamente frequente rilevare aree a diversa differenziazione, attribuibili pertanto ad istotipi differenti; negli studi che nella classificazione dell'OS canino comprendono anche l'istotipo combinato (in cui sono contemporaneamente presenti aree a diversa differenziazione), quest'ultimo risulta il pattern istologico più frequente (Misdorp e Hart, 1979; Kirpensteijn et al., 2002). Diverse ricerche hanno tuttavia evidenziato che a istotipi diversi non corrisponde un comportamento biologico diverso (Grundmann et al., 1995; Kirpensteijn et al., 2002), suggerendo di non considerare di fondamentale importanza la classificazione degli osteosarcomi in un istotipo o in un altro, quanto piuttosto di individuare altri elementi istologici maggiormente correlati alla prognosi; tra i parametri fino a oggi valutati il più promettente è il grading istologico, che si basa sulla valutazione di pleomorfismo nucleare, numero di mitosi e necrosi intratumorale (Straw et al., 1996; Kirpensteijn et al., 2002). Nella nostra casistica si è evidenziata una netta prevalenza dei gradi più alti, con rappresentazione di gradi di malignità diversi

nell'ambito dello stesso istotipo; è da segnalare, comunque, come già osservato da altri (Hammer et al., 1995; Misdorp e Hart, 1979), che l'OS telangectasico era di grado III, che i quattro OS fibroblastici erano di basso grado, e che gli OS a cellule giganti erano prevalentemente di alto grado.

Le prove immunistochemiche, oltre alla costante ed intensa espressione della vimentina, hanno evidenziato in una rilevante percentuale di casi una inaspettata positività per l'actina nel citoplasma delle cellule di OS, non rapportabile all'istotipo o al grado istologico. Tale riscontro, che non risulta segnalato finora nella letteratura scientifica, potrebbe essere in linea teorica collegato all'acquisizione da parte delle cellule neoplastiche di capacità di movimento autonomo, come risultato dell'autoselezione di particolari cloni cellulari nell'ambito dei fenomeni di evoluzione della popolazione neoplastica. Tale ipotesi potrebbe essere supportata dall'osservazione che studi in vitro su linee cellulari di OS di topo hanno evidenziato un'associazione fra la espressione di actina e l'acquisizione del fenotipo di chemioresistenza multipla (MDR-multidrug resistance), suggerendo quindi una relazione fra l'aberrante espressione citoplasmatica di actina e un comportamento più aggressivo della neoplasia (Takeshita et al., 1998).

L'attività proliferativa (AP), rilevata tramite valutazione analitica della percentuale di cellule positive per l'antigene nucleare Ki67 con l'anticorpo MIB1 è risultata molto eterogenea nell'ambito della casistica e significativamente correlata al grado istologico, ma non all'istotipo; nell'ambito dei parametri utili alla formulazione del grading, l'AP è risultata direttamente correlata alla quantità di mitosi, e non al grado di pleomorfismo nucleare ed alla quantità di cellule necrotiche. L'assenza di correlazioni evidenti fra istotipo e AP conferma la scarsa importanza ai fini prognostici della classificazione in istotipi e la potenziale utilità del grading istologico, anche se fra gli aspetti morfologici valutati, solo la quantità di mitosi è effettivamente correlata all'AP. È tuttavia da sottolineare come l'applicazione del grading istologico negli OS sia estremamente soggettiva. Hasegawa (2007) ha suggerito che nella formulazione del grading istologico dei sarcomi dei tessuti molli dell'uomo la quantità di mitosi potrebbe essere utilmente sostituita dal MIB1-index che, anche se più indaginoso in termini di valutazione, fornirebbe una stima più oggettiva dell'effettiva percentuale di cellule in ciclo. È inoltre da sottolineare l'estrema soggettività della valutazione del grado di pleomorfismo nucleare, che allo stesso modo potrebbe essere sostituito o integrato da valutazioni morfometriche. Infine, la quantità di necrosi intratumorale osservata è dipendente dal

numero di sezioni osservate e dalla quantità di tessuto campionato, e quindi non necessariamente rappresentativa del reale rapporto fra tessuto sano e necrotico. Nella casistica esaminata gli OS assiali hanno mostrato un'AP significativamente più elevata rispetto agli OS appendicolari (32,24% vs 14,94%), nonostante per questi ultimi sia riferito un comportamento più aggressivo (Heyman et al., 1992; Meuten, 2002), il che pone qualche dubbio sulla effettiva rilevanza prognostica dell'AP negli OS del cane. Infine, non era apprezzabile alcuna correlazione fra positività all'actina degli OS e AP.

In conclusione, in questo studio è stato possibile confermare in una casistica di 45 OS di cane gli aspetti riferiti dalla letteratura corrente riguardo agli aspetti anatomoclinici ed istopatologici. I sistemi di valutazione prognostici in uso sono tuttavia risultati solo parzialmente coerenti fra loro, e ciò suggerisce la necessità di approfondire meglio i rapporti fra parametri istologici e comportamento biologico in casistiche in cui sia anche disponibile un adeguato follow-up; i nostri risultati suggeriscono di comprendere fra tali parametri anche la valutazione del grado di espressione dell'actina, che sulla base dei dati raccolti potrebbe rappresentare un fattore prognostico indipendente da grado istologico e attività proliferativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Grundmann E., Roessner A., Ueda Y. et al. (1995) *Current aspect of the pathology of osteosarcoma*. Anticancer Res, 15:1023-1033.
2. Hammer A.S., Weeren F.R., Weisbrode S.E. et al. (1995) *Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones*. J Am Anim Hosp Assoc, 31: 321-326.
3. Hasegawa T. (2007) *Histological grading and MIB-1 labeling index of soft-tissue sarcomas*. Pathol Int, 57(3):121-5.
4. Heyman S.J., Diefenderfer D.L., Goldschmidt M.H. et al. (1992) *Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989)*. Vet Surg, 21(4):304-310.
5. Jongeward S.J. (1985) *Primary bone tumors*. The Vet Clin North Am Small Anim Pract, 15:609-641.
6. Kirpensteijn J., Kik M., Rutteman G.R., Teske. (2002) *Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma*. Vet Pathol, 39: 240-246.
7. Loukopoulos P., Robinson W.F. (2007) *Clinicopathological relevance of tumour grading*

- in canine osteosarcoma. *Journal of comparative Pathology*, 136: 65-73.
8. Marconato L. (2005) *Tumori dello scheletro*. In : *Oncologia medica dei piccoli animali*, Marconato L., Del Piero F., Paletto editore, Milano. Capitolo 19, pp. 355-379.
 9. Misdorp W., Hart A.A. (1979) *Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma*. *J Natl Cancer Inst*, 62:537-545.
 10. Ohta G., Sakai H., Kachi S. et al. (2004) *Assessment of proliferative potentials of canine osteosarcomas and chondrosarcomas by MIB-1 immunohistochemistry and bromodeoxyuridine incorporation*. *Journal of comparative Pathology*, 131:18-27.
 11. Slayter M.V., Boosinger T.R., Pool R.R. et al. (1994) *Histological Classification of Bone and Joint Tumors of Domestic Animals*. World Health Organization. II serie, vol. 1. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.
 12. Straw R.D., Powers B.E., Klausner J. et al. (1996) *Canine Mandibular Osteosarcoma : 51 Cases (1980-1992)*. *J Am Anim Hosp Assoc*, 32:257-262.
 13. Takeshita H., Kasuzaki K., Ashihara T. et al. (1998) *Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance*. *Cancer Letters*, 126:75-81.
 14. Thompson K.G., Pool R.R. (2002) *Tumors of bones*. In : *Tumors in domestic animals*, Meuten D.J., IV edizione, Iowa State Press, Iowa. Capitolo 5, pp. 245-317.



Parametri istologici	Descrizione	Valore
<i>Pleomorfismo nucleare</i>	Nessuno	1
	Moderato	2
	Marcato	3
<i>Mitosi (n°/10 hpf 400x)</i>	1-10	1
	11-20	2
	21-30	3
	>30	4
<i>Quantità di tessuto necrotico (%)</i>	Assente	0
	<15%	1
	15-50%	2
	>50%	3
Grado istologico		
<i>Da 1 a 5 = Grado I</i>		
<i>Da 6 a 7 = Grado II</i>		
<i>Da 8 a 10 = Grado III</i>		

Tabella 1. Sistema di grading istologico dell'OS del cane (Straw et al., 1996).

Istotipo	Osteosarcomi appendicolari	Osteosarcomi assiali	Totale
<i>OS osteoblastico</i>	25 (69,4%)	5 (55,6%)	30 (66,7%)
<i>OS fibroblastico</i>	4 (11,1%)	1 (11,1%)	5 (11,1%)
<i>OS a cellule giganti</i>	3 (8,3%)	1 (11,1%)	4 (8,9%)
<i>OS poco differenziato</i>	2 (5,6%)	1 (11,1%)	3 (6,7%)
<i>OS condroblastico</i>	1 (2,8%)	1 (11,1%)	2 (4,4%)
<i>OS teleangectasico</i>	1 (2,8%)	-	1 (2,2%)

Tabella 2. Frequenza dei differenti istotipi nei casi di OS.

Istotipo	n° di casi	%
<i>OS osteoblastico</i>	25	64,1
Grado I	8	32
Grado II	10	40
Grado III	7	28
<i>OS fibroblastico</i>	4	10,3
Grado I	2	50
Grado II	2	50
Grado III	0	0
<i>OS a cellule giganti</i>	4	10,3
Grado I	1	25
Grado II	0	0
Grado III	3	75
<i>OS poco differenziato</i>	3	7,7
Grado I	0	0
Grado II	3	100
Grado III	0	0
<i>OS condroblastico</i>	2	5,1
Grado I	1	50
Grado II	1	50
Grado III	0	0
<i>OS teleangectasico</i>	1	2,6
Grado III	1	100
Totali	39	100,0

Tabella 3. Rapporto tra istotipo e grado istologico nei casi di OS

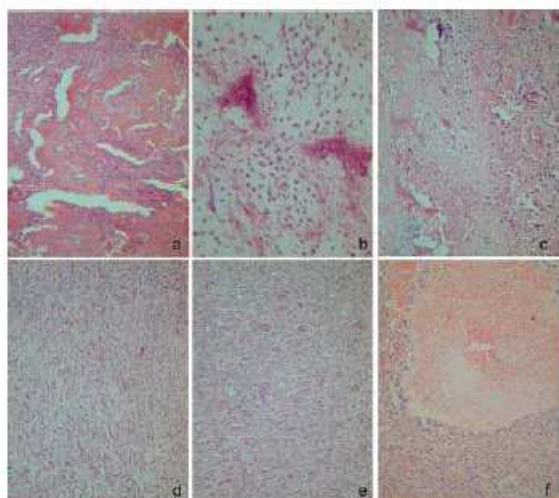


Figura 1. a) *OS osteoblastico*. Abbondante produzione di matrice osteoide da parte degli osteoblasti neoplastici. E.E.; b) *OS poco differenziato*. Osteoblasti neoplastici simili a cellule reticolari del midollo osseo che depongono osteoide. E.E.; c) *OS condroblastico*. Gli osteoblasti neoplastici producono sia matrice osteoide che condroide. E.E.; d) *OS fibroblastico*. Cellule fusate simili a quelle di fibrosarcoma, con scarsa tendenza alla deposizione di osteoide. E.E.; e) *OS a cellule giganti*. Presenza di numerose cellule giganti multinucleate. E.E.; f) *OS teleangectasico*. Le cellule sarcomatose delimitano lacune ripiene di sangue e occasionalmente producono sostanza osteoide. E.E.

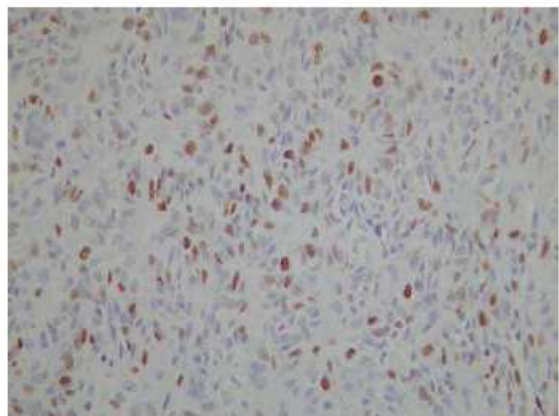


Figura 3. OS osteoblastico. Colorazione immunoistochimica con anticorpo MIB1. Positività nucleare intensa ed in un elevato numero di cellule.

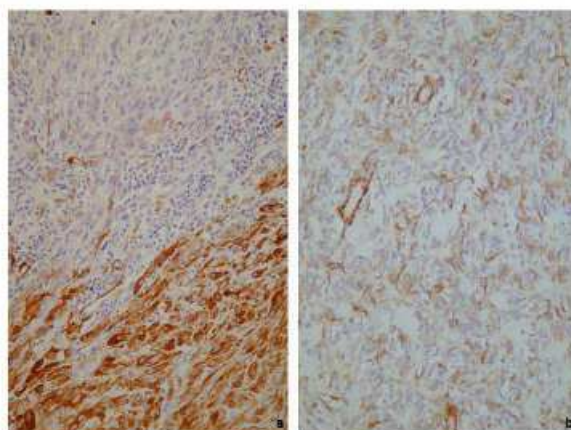


Figura 2. a) OS osteoblastico. Intensa espressione immunoistochimica di actina in parte delle cellule neoplastiche. Actina; b) OS osteoblastico. L'espressione di actina è limitata alla parete dei microvasi intratumorali. Actina.



CANINE OSTEOSARCOMA. HISTOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 45 CASES

Forty-five canine osteosarcomas (OS) were histologically classified and graded, and a immunohistochemistry panel was applied. The composition of the studied OS population was comparable to that of previous studies: appendicular OS were more frequent than axial (80% vs 20%); within appendicular OS, forelimb location was prevalent (72.2% vs 27.8%), and large to giant breeds were mostly represented. Osteoblastic OS was the more frequent histotype (66.7%), followed by fibroblastic (11.1%), giant cells (8.9%), poorly differentiated (6.7%), chondroblastic (4.4%) and teleangectatic (2.2%). Histologic grading (featuring nuclear pleomorphism, number of mitoses and amount of intratumoral necrosis) prompted grade I in 28.2% of cases, grade II in 41% and grade III in 30.8%; there was no relation between histologic grade and histotype.

Immunohistochemistry, beside marked expression of vimentin in all cases, evidenced in several cases (76.9%) a moderate to strong cytoplasmic positivity to smooth muscle actin, not related to histotype or histologic grade. Proliferative activity (PA), assessed by the analytic evaluation of the percentage of cells expressing the nuclear antigen Ki67 (MIB1-index), was directly related to the number of mitoses and histologic grade, but not to nuclear pleomorphism, necrosis amount and actin expression. Axial OS displayed a PA higher than appendicular OS.

Key words: osteosarcoma, dog, histologic grading, immunohistochemistry, proliferative activity.

MASTOCITOMA CANINO CON COINVOLGIMENTO MIDOLLARE:
CARATTERISTICHE CLINICHE, PATOLOGICHE
ED OPZIONI TERAPEUTICHE PER NELL'ERA DELL'IMATINIB

Laura Marconato¹ Med Vet; Giuliano Bettini² Med Vet, Prof Ass
Claudio Giacoboni¹ Med Vet; Giorgio Romanelli³ Med Vet, Dipl ECVS
Alessandro Cesari² Med Vet; Andrea Zatelli⁴ Med Vet
Eric Zini⁵ Med Vet, Dipl ECVIM

¹ *Libero professionista, Clinica Veterinaria L'Arca, Napoli*

² *Dipartimento di Sanità Pubblica e Patologia Animale,
Università di Bologna, Ozzano Emilia*

³ *Libero professionista, Clinica Veterinaria Nerviano, Nerviano (MI)*

⁴ *Libero professionista, Clinica Veterinaria Pirani, Reggio Emilia*

⁵ *Clinic for Small Animal Internal Medicine, Vetsuisse Faculty,
University of Zürich, Zürich*

Introduzione. Il coinvolgimento neoplastico midollare in corso di mastocitoma è da considerarsi un raro evento, contraddistinto da decorso clinico aggressivo e rapido, e prognosi inevitabilmente infausta. Il trattamento è perlopiù sintomatico. La somministrazione di chemioterapici deve essere attentamente valutata, dal momento che l'infiltrazione neoplastica midollare si accompagna generalmente a citopenie periferiche. Ad oggi non esistono studi prospettici su trattamenti volti a eradicare l'infiltrazione midollare.

Scopo del lavoro. Descrivere le caratteristiche clinico-patologiche di mastocitomi canini con infiltrazione midollare e confrontare in senso prospettico il decorso clinico di pazienti sottoposti a terapia sintomatica, chemioterapia e terapia a bersaglio molecolare.

Materiali e Metodi. Venivano inclusi cani con mastocitoma cutaneo sottoposti a stadiazione completa con infiltrazione neoplastica midollare (mastociti >10% di tutte le cellule nucleate o, se atipici, >5%). I cani venivano assegnati ai seguenti gruppi: trattamento sintomatico con antistaminici e cortisone; lomustina in monochemioterapia; imatinib. A causa del costo elevato del trattamento con imatinib, l'assegnazione nei gruppi non era randomizzata. Per valutare la risposta antitumorale, la stadiazione veniva ripetuta mensilmente.

Risultati. Venivano inclusi 13 cani: 10 avevano un nodulo cutaneo singolo e 3 avevano noduli multipli. Il coinvolgimento di linfonodi regionali, milza o fegato era comune; in tutti i cani era dimostrato coinvolgimento midollare (mastociti: 17-85% di ANC). L'esame emocromocitometrico evidenziava comunemente: anemia non rigenerativa, leucopenia o trombocitopenia. In 4 cani si osservavano mastociti circolanti. In 4 cani non si evidenziava alcuna anomalia ematologica, nonostante infiltrazione midollare pari a 17-33%. L'ema-

tochimica evidenziava aumento di fosfatasi alcalina e alanina transferasi in 11 e 10 cani, rispettivamente.

Otto cani erano trattati con lomustina, 2 con imatinib e 3 con trattamento sintomatico. Imatinib era somministrato soltanto se il tumore mostrava espressione immunocitochimica aberrante (citoplasmatica) di KIT.

Il trattamento con lomustina induceva remissione parziale in un caso su 8, con sopravvivenza mediana di 43 giorni (range, 14-57). I 2 cani trattati con imatinib ottenevano remissione completa, con sopravvivenza di 117 e 159 giorni. I cani trattati solo con terapia sintomatica venivano sottoposti ad eutanasia dopo 1, 14 e 32 giorni, senza alcuna risposta evidenziabile.

Conclusioni. Il mastocitoma può avere comportamento biologico estremamente variabile, pertanto la stadiazione completa è fondamentale per valutare l'estensione neoplastica. In particolare, la scrupolosa valutazione clinica e laboratoristica rappresentano un valido aiuto nell'identificare pazienti con infiltrazione midollare. Questo studio conferma aggressività e scarsa trattabilità di mastocitoma con infiltrazione midollare e suggerisce per la prima volta il potenziale vantaggio terapeutico di imatinib in pazienti selezionati.

Bibliografia

1. Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2007: 402-424.
2. O'Keefe DA, Couto CG, Burke-Schwartz C, Jacobs RM. Systemic mastocytosis in 16 dogs. J Vet Intern Med 1987; 1:75-80.
3. Takahashi T, Kadosawa T, Nagase M, et al. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). J Am Vet Med Assoc 2000; 216:222-226.
4. Bookbinder PF, Butt MT, Harvey HJ. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. J Am Vet Med Assoc 1992; 200:1648-1650.
5. McManus PM. Frequency and severity of mastocytosis in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995-1997). J Am Vet Med Assoc 1999; 215:355-357.
6. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, et al. Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999-2002). Vet Comp Onc 2007; 5:31-37.
7. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, et al. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. Neoplasia 2006; 8:104-111.
8. Webster JD, Kiupel M, Kaneene JB, et al. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol 2004; 41:371-377.
9. London C. Kinase inhibitors in cancer therapy. Vet Comp Onc 2004; 2(4):177-193.

Indirizzo per la corrispondenza:

Laura Marconato

Clinica Veterinaria L'Arca

Vico Cacciottoli, 46/47 - 80129 Napoli

E-mail: lauramarconato@yahoo.it

Espressione del recettore KIT (CD117) nel mastocitoma del cane: confronto citologia-istologia in 26 casi

Cesari A, Bettini G, Scarpa F, Morini M, Marconato L, Capitani O.e Zini E

alessandro.cesari2@unibo.it

Introduzione

Il recettore CD117 (KIT o Stem Cell Factor Receptor) è una proteina transmembrana ad attività tirosin-chinasica normalmente presente nelle cellule germinali, nelle cellule mieloidi immature e nei mastociti. Nei mastociti è possibile verificare con l'immunoistochimica l'esclusiva localizzazione di CD117 a livello di membrana citoplasmatica. Nel mastocitoma del cane l'espressione di CD117 è mantenuta, ma spesso delocalizzata, con comparsa di positività a livello citoplasmatico. In particolare, l'immunopositività viene graduata come KIT-pattern 1 se la positività è esclusivamente limitata alla membrana citoplasmatica, KIT-pattern 2 se la proteina KIT è presente anche a livello citoplasmatico sotto forma di aggregati multipli puntiformi o singoli a livello paranucleare, KIT-pattern 3 in caso di positività citoplasmatica intensa e diffusa.

Diversi studi hanno correlato la localizzazione di tale espressione al grado istologico e al comportamento biologico del mastocitoma, evidenziando la frequente associazione fra internalizzazione del recettore, minor differenziazione e comportamento più aggressivo. Inoltre, la localizzazione citoplasmatica del segnale immunoistochimico può indicare mutazioni attivanti del proto-oncogene c-kit, a suggerire una potenziale efficacia del trattamento con farmaci antitirosinchinasici.

Materiali e metodi

Poiché la diagnosi di mastocitoma nel cane e nel gatto è generalmente raggiunta con ottima specificità tramite la citologia agoaspirativa, si è voluto verificare se l'applicazione di metodiche immunocitochimiche per il CD117 a preparati citologici normalmente allestiti poteva fornire le stesse indicazioni dell'immunoistochimica, quanto ad intensità e localizzazione della positività.

Risultati e discussione

Nei 26 casi testati è stato possibile verificare attraverso il test k una buona concordanza fra i risultati delle due tecniche, soprattutto se i KIT-pattern 2 e 3 vengono considerati insieme, evidenziando quindi che la valutazione dell'espressione del recettore KIT su preparati citologici fornisce nella maggior parte dei casi risultati simili a quelli ottenuti su preparati istologici, ma in tempi più rapidi e utilizzando campioni prelevabili con maggiore semplicità. È stato inoltre verificato che gli strisci post-fissati in acetone mantengono una soddisfacente immunoreattività per circa 10 settimane,

mentre non è stato possibile recuperare la reattività nei preparati precedentemente colorati con May Grünwald – Giemsa.

Valutazione comparativa di attività proliferativa, differenziazione ed espressione immunoistochimica di CD117 nelle metastasi linfonodali rispetto al tumore primitivo nel mastocitoma del cane

Scarpa F, Cesari A, Morini M, Marconato L, Capitani O e Bettini G

filippo.scarpa2@unibo.it

Introduzione

Il mastocitoma (MCT) è una delle neoplasie cutanee più comuni del cane, in cui rappresenta il 7-21% di tutte le neoplasie cutanee. Il comportamento biologico del mastocitoma è molto variabile; mentre alcuni sono tendenzialmente benigni e trattabili con successo con la sola chirurgia, altri mostrano crescita rapida e tendenza a dare metastasi. Per definire la prognosi della malattia è stato proposto lo studio di numerosi fattori. Fra quelli di pertinenza istopatologica quelli risultati più attendibili sono il grado istologico, alcuni marker di proliferazione cellulare (Ki67, AgNOR), la vascolarizzazione intratumorale, e il tipo di espressione immunoistochimica del recettore tirosin-chinasico CD117 (KIT pattern).

Le popolazioni neoplastiche sono spesso un insieme di cloni cellulari dotati di caratteristiche biologiche diverse, nel cui contesto avvengono continui fenomeni evolutivi che generalmente portano alla selezione del clone con maggiore attività replicativa e dotato di maggiori capacità invasive. Sebbene si tenda ad assumere l'uguaglianza fra tumore primitivo e metastasi, la popolazione cellulare che colonizza siti distanti è il risultato di tale selezione, e pertanto dovrebbe essere portatrice di maggiori caratteri di malignità.

Materiali e metodi

Allo scopo di valutare un'eventuale espressione differenziale di fattori prognostici istopatologici fra tumore primitivo e metastasi linfonodali, è stata selezionata una casistica di mastocitomi di cane in cui al momento dell'asportazione chirurgica del tumore fosse stato rimosso anche il linfonodo tributario, e che questo fosse risultato positivo all'esame istologico.

Sui casi selezionati sono state eseguite le seguenti determinazioni, sia sul tumore primitivo che sulla metastasi linfonodale: grado di differenziazione (in sezioni colorate con ematossilina e blu di toluidina); espressione dei marker di proliferazione cellulare AgNOR (tramite procedura istochimica di colorazione argentea e analisi quantitativa della reazione) e Ki67 (tramite colorazione immunoistochimica con anticorpo MIB-1 e quantificazione della quota cellulare proliferante); valutazione dell'espressione del recettore KIT (colorazione immunoistochimica per CD117 e valutazione qualitativa della localizzazione della positività).

Risultati

Sono stati complessivamente valutati 14 casi di mastocitoma cutaneo di cane in cui l'esame istologico ha confermato la presenza di metastasi linfonodali. Il grado istologico del tumore primitivo era 2 in 10 casi e 3 nei restanti 4 casi; in 9 casi la metastasi linfonodale era di tipo nodulare e in 5 casi rappresentata da sparsi aggregati di 5-10 mastociti. I casi in cui nelle sezioni istologiche di linfonodo erano presenti sporadici mastociti sotto forma di elementi isolati sono stati esclusi dallo studio.

Il confronto dei parametri considerati ha evidenziato in 4 casi una minore differenziazione dei mastociti metastatici rispetto a quelli presenti nel tumore primitivo. I parametri di attività proliferativa (AgNOR, Ki67) hanno evidenziato una significativa maggiore attività cinetica nelle metastasi rispetto al tumore primitivo. La valutazione immunoistochimica di CD117 ha evidenziato in tutti i casi la sovraespressione del recettore (tumori primitivi: KIT-pattern 2 in 9 casi, KIT-pattern 3 in 5 casi), con la tendenza dell'immunoreattività a mantenersi costante fra tumore primitivo e metastasi. In 4 casi nei mastociti metastatici la sovraespressione di KIT era quantitativamente inferiore.

Discussione

Lo studio ha messo in evidenza differenze qualitative e quantitative nell'espressione di marker prognostici fra tumore primitivo e metastasi linfonodali. Al di là delle considerazioni di biologia dei tumori che possono essere responsabili di tali differenze, nella valutazione complessiva dei singoli casi deve essere tenuto in considerazione che i parametri istopatologici di prognosi possono manifestare differenze anche sensibili secondo la sede da cui è stato prelevato il campione.

Set up dell'analisi di genescanning per l'identificazione delle mutazioni somatiche del mastocitoma canino

Turba ME, Bettini G, Calzolari C, Marconato L, Cesari A, Morini M e Gentilini F

claudia.calzolari@libero.it

Introduzione

L'identificazione a livello molecolare di mutazioni del proto-oncogene *c-KIT* nel mastocitoma canino può avere importanti ricadute in termini prognostici e/o fornire importanti indicazioni sul tipo di risposta alla terapia. Mutazioni *c-KIT* sono presenti in proporzione variabile a seconda degli studi tra l'8% e il 35% dei mastocitomi canini ma fino al 50% dei mastocitomi di grado 2 e 3¹⁻³.

L'indicazione più importante che può fornire l'analisi genetica è legata all'evidenza che tali mutazioni comportano l'attivazione costitutiva di *c-KIT* e quindi una dis-regolata attività tirosin-chinasica che rappresenta il bersaglio molecolare di farmaci come Gleevec®⁴.

La presenza di mutazioni è correlata significativamente a valori sfavorevoli di predittori come Ki67 e AgNOR, così come la presenza di mutazioni è correlata significativamente alla presenza di patterns di localizzazione aberrante citoplasmatica del recettore *KIT*⁵.

Con queste premesse, gli autori hanno ritenuto che un test molecolare rapido ed accurato potesse risultare estremamente utile nella clinica oncologica veterinaria.

Materiali e metodi

E' stata disegnata una coppia di primer che consentisse di amplificare mediante PCR la regione di DNA corrispondente all'esone 11 ed alla porzione 5' dell'introne 11 di *c-KIT* comprendente sia le regioni delle mutazioni *internal tandem duplications* (ITDs) sia piccole delezioni di 3-6 bp^{3,4,6}.

Il primer forward è stato marcato in posizione 5' con fluoroforo 6-FAM. Sono stati inclusi nella messa a punto del test genetico 5 casi di mastocitomi canini spontanei ed 1 tessuto canino normale come controllo negativo. In 1 caso il DNA è stato estratto sia da sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina sia dal corrispondente tessuto congelato a -80°C, in altri casi il DNA è stato estratto dal vetrino fissato e colorato con May Grunwald-Gimsa sia dal materiale strisciato e non colorato. Il DNA è stato poi amplificato mediante PCR su termociclatore Eppendorf EP Gradient S. Successivamente 1 µl del prodotto di PCR opportunamente diluito a concentrazioni variabili tra 1:20 e 1:40 è stato aggiunto a 20 µl di formamide e 0.1 µl di size standard. Il campione è stato poi analizzato in doppio con sequenziatore automatico ABI Prism 310 (Applied Biosystem) fornito di capillare di 47 cm di lunghezza caricato con Performance Optimized Polymer-4 alle

condizione di iniezione di 15 KV per 5 secondi; il risultato analizzato con software dedicato GeneMapper HID v.3.2.

Risultati

La PCR ha consentito di amplificare un prodotto di peso atteso di 201 bp corrispondente all'allele wild type sia nel controllo negativo sia in tutti i tessuti di mastocitoma. In due casi l'analisi ha evidenziato un secondo picco di peso 240 bp e 249 bp. Tali risultati hanno chiaramente permesso di individuare nei due casi una mutazione ITD. I risultati prodotti dall'analisi della sezione istologica sono risultati del tutto identici a quello ottenuto dal corrispondente campione congelato.

Discussione

Gran parte della bibliografia disponibile riporta l'analisi delle mutazioni del gene *c-KIT* mediante visualizzazione su gel di agarosio al 2%. Tale tecnica di visualizzazione ha scarso potere di risoluzione e non consente di individuare delezioni o inserzioni di poche basi. L'analisi mediante analisi di frammento su sequenziatore automatico (GeneScanning) presenta numerosi vantaggi rispetto alla tecnica tradizionale: in primo luogo consente di discriminare prodotti di PCR che differiscono anche di 1 solo nucleotide; in secondo luogo è estremamente accurata e riproducibile e consente di misurare con precisione la dimensione dell'inserzione o delezione.

10. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, et al. The role of c-kit in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 2006; 8:104-111.
11. Downing S, Chien MB, Kass PH, et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63:1718-1723.
12. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. *Vet. Pathol.* 2002; 39: 529-535.
13. Ma Y, Longley BJ, Wang X, et al. Clustering of activating mutations in *c-KIT*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J. Invest Dermatol*; 1999, 112: 165-170.
14. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-kit and its role in prognostication. *Vet Pathol* 2007; 44:298-308.
15. London CA, Galli SJ, Yuuki T, et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 1999; 27: 689-697

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Principi di base per l'applicazione delle metodiche immunocitochimiche alla citologia	3
2. STANDARDIZZAZIONE DELLA METODICA.....	9
2.1 Materiali e Metodi	9
2.1.1 Campioni	9
2.1.2 Supporti	10
2.1.3 Allestimento	10
2.1.4 Fissazione	10
2.1.5 Stoccaggio dei campioni	11
2.1.6 Inibizione delle perossidasi	11
2.1.7 Reidratazione dei campioni.....	11
2.1.8 Smascheramento antigenico.....	12
2.1.9 Pannello anticorpale	12
2.1.10 Metodi di incubazione.....	13
2.1.11 Sistema di rivelazione	13
2.1.12 Colorazione di contrasto e montaggio dei vetrini	14
2.1.13 Controlli	15
2.1.14 Valutazione della positività.....	15
2.2 Risultati.....	16
2.2.1 Campioni	16
2.2.2 Supporti	16
2.2.3 Allestimento	16
2.2.4 Fissazione	16
2.2.5 Stoccaggio dei campioni	21
2.2.6 Inibizione delle perossidasi	21
2.2.7 Reidratazione dei campioni.....	21
2.2.8 Smascheramento antigenico.....	21
2.2.9 Pannello anticorpale	22
2.2.10 Metodi di incubazione.....	23
2.2.11 Sistema di rivelazione	24
2.2.12 Colorazione di contrasto e montaggio dei vetrini	24
2.2.13 Controlli	25
2.3 Discussione.....	26
2.4 Conclusioni.....	28
3. APPLICAZIONE DELLA TECNICA IMMUNOCITOCHIMICA AI PREPARATI CITOLOGICI	29
3.1 Materiali e metodi	29
3.1.1 Campioni	29
3.1.2 Allestimento	29

3.1.3 Fissazione	30
3.1.4 Stoccaggio dei campioni	30
3.1.5 Tecniche preparatorie particolari	30
3.1.6 Inibizione delle perossidasi	30
3.1.7 Reidratazione dei campioni.....	31
3.1.8 Pannello anticorpale	31
3.1.9 Metodi di incubazione.....	32
3.1.10 Sistema di rivelazione	32
3.1.12 Colorazione di contrasto e montaggio dei vetrini	32
3.1.13 Controlli	33
3.1.14 Valutazione della positività.....	33
3. 2 Risultati	35
3.2.1 Campioni	35
3.2.2 Stoccaggio dei campioni	35
3.2.3 Tecniche preparatorie particolari	36
3.2.4 Pannello anticorpale	36
3.3 Discussione.....	53
3.3.1 Tipizzazione delle neoplasie	56
3.3.2 Differenziazione tra lesione reattiva e neoplastica	59
3.3.3 Valutazione dell'espressione di markers di interesse prognostico e terapeutico	62
3.3.4 Altre indicazioni.....	62
3.4 Conclusioni.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	66
4. CASI CLINICI	74
4.1 Versamento di origine carcinomatosa.....	74
4.1.1 Riassunto	74
4.1.2 Introduzione	74
4.1.3 Caso clinico.....	75
4.1.4 Discussione	77
4.1.5 Conclusioni	79
BIBLIOGRAFIA	80
4.2 Sinoviosarcoma	82
4.2.1 Riassunto	82
4.2.2 Introduzione	82
4.2.3 Caso clinico.....	83
4.2.4 Discussione	85
4.2.5 Conclusioni	86
BIBLIOGRAFIA	87

4.3 Sarcoma istiocitario.....	89
4.3.1 Riassunto	89
4.3.2 Introduzione	89
4.3.3 Caso clinico.....	90
4.3.4 Discussione	93
4.3.5 Conclusioni	95
BIBLIOGRAFIA	95
4.4 Linfoma spinale.....	97
4.4.1 Riassunto	97
4.4.2 Introduzione	97
4.4.3 Caso clinico.....	97
4.4.4 Discussione	100
4.4.5 Conclusioni	101
BIBLIOGRAFIA	101
5. VALUTAZIONE DEL RECETTORE KIT (CD117) NEI MASTOCITOMI CUTANEI DEL CANE E DEL GATTO	103
5.1 Introduzione.....	103
5.2 Materiali e Metodi	105
5.3 Risultati.....	109
5.4 Discussione.....	113
5.5 Conclusioni.....	115
BIBLIOGRAFIA.....	116
ALLEGATI	
• Immunohistochemical expression of h-telomerase reverse transcriptase in canine and feline meningiomas	121
• Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement	126
• Feline intestinal T-cell lymphoma: assessment of morphologic and kinetic features in 30 cases	133
• Valutazione dell'espressione immunocitochimica di CD117 in preparati citologici di mastocitoma.....	136
• Osteosarcoma del cane. Studio istologico ed immunoistochimico di 45 casi.....	142
• Mastocitoma canino con coinvolgimento midollare: caratteristiche cliniche, patologiche ed opzioni terapeutiche per nell'era Imatinib	150
• Espressione del recettore KIT (CD117) nel mastocitoma del cane: confronto citologia-istologia in 26 casi.....	152

- Valutazione comparativa di attività proliferativa, differenziazione ed espressione immunoistochimica di CD117 nelle metastasi linfonodali rispetto al tumore primitivo nel mastocitoma del cane..... 154
- Set up dell'analisi di genescanning per l'identificazione delle mutazioni somatiche del mastocitoma canino 156.

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Vantaggi e svantaggi dei principali metodi di allestimento dei preparati citologici.....	6
Tabella 2: Principali cause di “Falsi” nell'applicazione delle metodiche Immunocitochimiche	8
Tabella 3: Anticorpi sui quali è stata effettuata la standardizzazione.....	12
Tabella 4: Localizzazione della positività degli anticorpi indagati nelle cellule dei preparati	23
Tabella 5: Anticorpi utilizzati nelle indagini immunocitochimiche	31
Tabella 6: Campioni utilizzati per i test immunocitochimici.....	35
Tabella 7: Indicazioni per l'uso dei test immunocitochimici sui preparati citologici.....	35
Tabella 8: Epitopi valutati nella distinzione tra versamenti di natura reattiva o neoplastica; nella tipizzazione delle neoplasie e markers prognostici ricercati	38
Tabella 9: Numero di anticorpi applicati per caso	47
Tabella 10: Influenza del tipo di allestimento sui risultati della diagnostica immunocitochimica nella tipizzazione dei tumori.....	48
Tabella 11: Efficacia diagnostica dell'immunocitochimica nella tipizzazione delle neoplasie in 30 casi	48
Tabella 12: Efficacia della differenziazione immunocitochimica tra lesioni reattive e neoplastiche nei preparati da versamento.....	49
Tabella 13: Contributo dell'immunocitochimica alla diagnosi citologica di tumore.....	51
Tabella 14: Cause dei risultati equivoci.....	52
Tabella 15: Positività attesa delle cellule carcinomatose, delle cellule mesoteliali e delle cellule infiammatorie al pannello anticorpale testato (caso 1).....	79
Tabella 16: Riassunto delle positività delle neoplasie in diagnosi differenziale ai markers indagati (caso 3)	95
Tabella 17: Pattern di espressione del recettore KIT nei preparati di cane e gatto.....	110
Tabella 18: Risultati dell'applicazione delle tecniche immunoistochimica ed immunocitochimica a 25 campioni di mastocitoma cutaneo canino per la valutazione del KIT pattern.....	112

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Sistema di rivelazione ABC	13
Figura 2: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione con Citofix.....	18
Figura 3: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione in etanolo assoluto a 4°C per 10 minuti	18
Figura 4: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione in acetone a 4°C per 10 minuti	19
Figura 5: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione con fissativo di Delaunay per 10 minuti	19
Figura 6: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione in formalina per 10 minuti.....	20
Figura 7: Immunoreattività degli epitopi CD3, antigene comune mielo-istiocitario (MAC) e vimentina (VIM) dopo fissazione all'aria.....	20
Figura 8: Reattività dell'anticorpo anti-pancitocheratina (PanCK).....	38
Figura 9: Reattività dell'anticorpo anti-citocheratina 19 (CK19).....	39
Figura 10: Reattività dell'anticorpo anti-enolasi neuronale specifica (NSE).....	39
Figura 11: Reattività dell'anticorpo anti-citocheratina 5/6 (CK5/6)	40
Figura 12: Reattività dell'anticorpo anti-CD3	40
Figura 13: Reattività dell'anticorpo anti-mesotelina (MES)	41
Figura 14: Reattività dell'anticorpo anti-CD79 α	41
Figura 15: Reattività dell'anticorpo anti-citocheratina 14 (CK14)	42
Figura 16: Reattività dell'anticorpo anti-antigene comune mielo-istiocitario (MAC).....	42
Figura 17: Reattività dell'anticorpo anti-sinaptofisina (SYN)	43
Figura 18: Reattività dell'anticorpo anti-vimentina (VIM)	43
Figura 19: Reattività dell'anticorpo anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).....	44
Figura 20: Reattività degli anticorpi anti-CD18 canino e felino	44
Figura 21: Reattività dell'anticorpo anti- CD45RA	45
Figura 22: Reattività dell'anticorpo anti-CD117	45
Figura 23: Reattività dell'anticorpo anti-cromogranina A (CroA).....	46
Figura 24: Reattività dell'anticorpo anti-fattore VIII della coagulazione (FVIII)	46
Figura 25: Reattività dell'anticorpo anti-lisozima (LIS)	47

Figura 26: Preparato citologico del versamento colorato con May Grünwald–Giemsa (caso 1).....	75
Figura 27: Reazioni delle cellule presenti nel preparato al pannello anticorpale testato (caso 1).....	76
Figura 28: Preparato citologico (striscio da ago aspirato) colorato con May Grünwald–Giemsa (caso 2).....	84
Figura 29: Reazioni delle cellule presenti nel preparato al pannello anticorpale testato (caso 2).....	85
Figura 30: Preparato citologico del versamento colorato con May Grünwald–Giemsa (caso 3).....	91
Figura 31: Assenza di positività nelle cellule del preparato per gli anticorpi specifici per i markers linfocitari CD3 e CD79 α (caso 3)	91
Figura 32: Assenza di positività nelle cellule del preparato per gli anticorpi specifici per i markers CD117 e mesotelina (MES) (caso 3)	92
Figura 33: Assenza di positività nelle cellule del preparato per l'anticorpo specifico per la pancitocheratina (PanCK) e presenza di una forte positività citoplasmatica per il marker vimentina (VIM) (caso 3)	92
Figura 34: Presenza di una forte positività citoplasmatica nelle cellule del preparato per i markers antigene mielo-istiocitario comune (MAC) e lisozima (LIS) (caso 3).....	93
Figura 35: Preparato citologico (striscio da ago aspirato) colorato con May Grünwald–Giemsa (caso 4).....	99
Figura 36: Reattività delle cellule del preparato a gli anticorpi specifici per i markers linfocitari CD3 e CD79 α (caso 4)	99
Figura 37: Kit pattern in immunocitochimica ed immunoistochimica.....	108